



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Evaluación del Efecto de la Gammaglobulina Intravenosa
sobre Éxito Gestacional en Parejas con Fallo Reproductivo
Recurrente Asociado a Expansión de Células Natural
Killer. Identificación de Nuevos Biomarcadores.

Rocío Ramos Medina

Tesis presentada en la Universidad Autónoma de Madrid para optar al grado de Doctor

Madrid, 2012

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Evaluación del Efecto de la Gammaglobulina Intravenosa
sobre Éxito Gestacional en Parejas con Fallo Reproductivo
Recurrente Asociado a Expansión de Células Natural Killer.
Identificación de Nuevos Biomarcadores.**

Doctorando:

Rocío Ramos Medina, licenciada en Biología.

Presenta esta memoria para optar al título de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de Tesis:

Dra. Silvia Sánchez-Ramón

Dr. Jorge Alonso Zafra

El trabajo presentado en esta memoria para optar al grado de doctor en la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizado en el Departamento de Inmunología Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón bajo la dirección de la Dra. Silvia Sánchez Ramón y el Dr. Jorge Alonso Zafra.

Madrid, 2012

Dra. Silvia Sánchez-Ramón

Doctora en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid. Médico Adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Dr. Jorge Alonso Zafra

Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid. Director Médico de la Clínica Tambre

CERTIFICAN que:

Rocío Ramos Medina, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Inmunología Clínica, perteneciente al Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, el trabajo titulado ” Evaluación del efecto de la gammaglobulina intravenosa sobre éxito gestacional en parejas con fallo reproductivo recurrente asociado a expansión de Natural Killer. Identificación de nuevos biomarcadores”.

El presente trabajo cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

En Madrid, 7 de diciembre de 2012

Fdo. **Dra. Silvia Sánchez-Ramón**

Fdo. **Dr. Jorge Alonso Zafra**

El trabajo presentado en esta tesis ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (EC10-026) y la Fundación Tambre.

A MIS PADRES Y HERMANOS.

***“NO ES GRANDE EL QUE SIEMPRE TRIUNFA SINO EL QUE NUNCA SE
DESALIENTA”***

Martin Descalzo.

AGRADECIMIENTOS

¡GRACIAS!

Nunca una palabra tan sencilla pudo significar tanto. Cuando empecé mi aventura como pre-doctoral, no podía imaginarme como sería este momento en el que te ves delante del ordenador escribiendo por fin, LA TESIS. Han sido muchos años de sacrificios que por supuesto no los he llevado a cabo sola por ello es justo y necesario dar las gracias.

Gracias a Silvia, mi jefa, por apostar por mí, por haberme enseñado tanto, por abrirme las puertas de la Inmunología Reproductiva. **Gracias** por enseñarme a pensar, por hacerme ir un paso más allá. **Gracias** por tu confianza.

Gracias a Jorge, por sus críticas siempre constructivas.

Gracias a Bárbara e Irene por todas esas reflexiones en el cuartito. Por ser como sois, por vuestra ayuda. Por ser la alegría del departamento. A vuestro lado nunca me sentí una extraña.

Gracias a Marta por esos cafés, esas tardes en nuestro “pisito” pensando como diseñar los experimentos, por nuestras “gymkanas”, por tenerte siempre al lado, por los agobios y las alegrías compartidos. Siempre recordaré Granada.

Gracias a Loreto, por ser mi médico de confianza, por sus buenos consejos, **Gracias** por la “piscola” ha sido todo un descubrimiento. Siempre nos quedará Miguel Bosé.

Gracias a Laura, Daniela, Leticia y Lidia, por darme la oportunidad de conocerlos.

Gracias a Joaquín por responder siempre a todas mis dudas, por estar siempre dispuesto a echarme una mano. Por todas esas placas que hemos filtrado juntos.

Gracias a Margarita porque aunque no he sido residente, me adoptó como a uno de ellos, **Gracias** por preocuparte siempre de que no me faltara de nada.

Gracias a Áurea por su ayuda inestimable.

Gracias a Giovanna, mi primera jefa, **Gracias** por enseñarme a trabajar en un laboratorio. Por transmitirme tu gran sentido del trabajo bien hecho. Por inculcarme la necesidad de contrastar.

Gracias a María González Olivera mi GRAN AMIGA, once años juntas dan para mucho y tú siempre has sido un apoyo importante para mí. Gracias por sentir como tuyas tanto mis alegrías como mis angustias.

Gracias a Giacomo, por ser de las primeras personas que conocí cuando entré por primera vez en un laboratorio. Por esas tardes de Domingo.

Gracias a todas aquellas personas que de una forma u otra han estado presentes en mi vida durante este tiempo, de todos ellos he aprendido algo.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia. Los pilares de mi vida.

Gracias a mis PADRES (Javier y Carmen) por ese apoyo incondicional que siempre me habéis dado, por soportar mis momentos difíciles cuando todo lo veía negro y sólo vosotros creísteis en mí y me animasteis a continuar en el camino. Por todos esos días de nervios, ensayos, dudas, alegrías que me habéis permitido compartir con vosotros y que habéis vivido como vuestros. **Gracias** por ser tan generosos. **Gracias** por hacer de mí una persona libre y con conciencia. **Gracias** porque sin vosotros nada de esto habría sido posible.

Gracias a mis HERMANOS (Itziar y Jesús) sois los mejores hermanos que se puede tener, **Gracias** por escucharme, por soportar todos esos rollos con una sonrisa en la cara. **Gracias** por vuestro apoyo. Por preocuparos por mí. Porque al igual que papá y mamá vosotros también sois una pieza fundamental en mi vida.

Solo sintiendo el apoyo de una familia como vosotros esta Tesis ha sido posible. Este momento es tan vuestro como mío.

ÍNDICE.

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	8
Fallo Reproductivo. Conceptos y epidemiología.	9
1.1 Infertilidad	9
1.2 Fallo Reproductivo Recurrente	9
1.2.1 Aborto Recurrente	10
1.2.2 Fallo de Implantación Recurrente	10
1.3 Etiología	10
1.3.1 Causas de aborto recurrente en la mujer.	10
1.3.1.1 Factores epidemiológicos del aborto recurrente.	10
1.3.1.2 Factores Inmunológicos en el fallo reproductivo recurrente. Expansión de células Natural Killer.	12
1.4 El ciclo menstrual	13
1.4.1 Menstruación (días 1-4)	13
1.4.2 Fase proliferativa (días 5-13)	14
1.4.3 Ovulación/Fase secretora (días 14-28)	14
1.5 Inmunología del embarazo	14
1.5.1 Anatomía de la interfase materno-fetal. La placenta	14
1.5.2 Mecanismos de hiporrespuesta frente a aloantígenos fetales y de evasión fetal del sistema inmunitario materno.	16
1.5.3 Microquimerismo.	17
1.6 Potenciación de las células inmunorreguladoras maternas	17
1.6.1 Células Dendríticas	17
1.6.2 Células T gamma/delta (T $\gamma\delta$)	17
1.6.3 Células T reguladoras	18
1.6.4 Th1-Th2 en la gestación	19
1.6.5 Células Th17	20
1.6.6 Linfocitos B	20
1.7 Células Natural Killer	20
1.7.1 Receptores de células NK	22
1.7.1.1 Receptores específicos de las moléculas de HLA de clase I	23
1.7.1.2 Receptores no específicos de moléculas de HLA de clase I o de ligando desconocido	23
1.7.1.3 Receptores de citotoxicidad natural	23
1.7.1.4 NKG2D	24
	XV

1.7.1.5	CD16 (<i>FcγRIIIA</i>)	24
1.7.2	Células NK uterinas	24
1.7.2.1	NK endometriales	24
1.7.2.2	NK deciduales	25
-	Control de la invasión del trofoblasto	26
-	Angiogénesis	27
-	Migración de células NK hacia el útero	28
-	Diferenciación propia a partir de células progenitoras locales	29
1.7.3	Células Natural Killer T	29
1.8	Acción de las hormonas sexuales durante la gestación.	30
1.9	Inmunoterapia	31
1.10	Inmunoterapia con gammaglobulinas en fallo reproductivo recurrente	32
1.11	Otras terapias inmunomoduladoras	33
1.11.1	Glucocorticoides	34
1.11.2	Anticuerpos monoclonales anti-TNF- α .	34
1.11.3	Intralípidos	35
1.11.4	Factor estimulador de colonias de granulocitos	35
1.11.5	Vitamina D	35
1.11.6	Terapia hormonal sustitutiva tiroidea	36
1.12	Mecanismos de acción de la GGIV	36
1.12.1	Estructura de la molécula de inmunoglobulina	37
1.12.2	Efectos dependientes de Fc	38
1.12.2.1	Bloqueo o saturación funcional de los receptores Fc	38
1.12.2.2	Inhibición del sistema del complemento	38
1.12.2.3	Expansión de los linfocitos T CD4 ⁺ reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺)	38
1.12.2.4	Disminución del número de monocitos CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ proinflamatorios	39
1.12.3	Efectos dependientes de Fab	40
1.12.3.1	Bloqueo de los fragmentos C3a y C5a	40
1.12.3.3	Activación o bloqueo funcional del receptor de muerte Fas (CD95)	41
1.12.3.4	Unión a lectinas	41
1.12.4	Efectos dependientes de Fc y Fab	42
1.12.4.1	Supresión de la producción de citoquinas, inductor de antagonistas de estas y modulación de moléculas de adhesión	42
1.12.4.2	Modulación de las propiedades de las células dendríticas	43
1.12.4.3	Regulación de los linfocitos B	43

2. OBJETIVOS	45
3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS	47
3.1 Diseño del estudio	48
3.2 Sujetos del estudio.	49
3.2.1 Estudio observacional retrospectivo en mujeres con fallo reproductivo recurrente tras tratamiento con gammaglobulina intravenosa.	49
3.3 Protocolo clínico. Variables estudiadas.	49
3.3.1 Variables epidemiológicas	50
3.3.2 Variables clínicas	50
3.3.3 Variables inmunológicas	50
3.3.4 Variables de seguridad	50
3.4 Técnicas de laboratorio.	51
3.4.1 Extracción y procesamiento de las muestras de sangre.	51
3.4.2 Inmunofenotipaje de las subpoblaciones de las células natural killer de sangre periférica.	51
3.4.3 Protocolo para el tratamiento con Inmunoglobulina intravenosa	53
3.5 Técnicas estadísticas.	53
3.5.1 Procesamiento de los datos	53
3.5.2 Distribución de las variables	53
3.5.2.1 <i>Test de Kolmogorov-Smirnov</i>	53
3.5.3 Tablas de contingencia	53
3.5.3.1 <i>Prueba chi-Cuadrado de Pearson</i>	53
3.5.4 Pruebas paramétricas	54
3.5.4.1 <i>Prueba t-Student</i>	54
3.5.4.2 <i>Coeficiente de correlación lineal de Pearson (r)</i>	54
3.5.4.3 <i>Análisis de la varianza</i>	54
3.5.4.4 <i>Análisis de la varianza para medidas repetidas</i>	54
3.5.4.5 <i>Regresión lineal múltiple</i>	54
3.5.4.6 <i>Regresión Logística</i>	55
3.5.5 Pruebas no paramétricas	56
3.5.5.1 <i>“H” de Kruskal-Wallis</i>	56
3.5.5.2 <i>“U” de Mann-Whitney</i>	56
3.5.5.3 <i>Prueba de Wilcoxon</i>	56
3.5.5.4 <i>Análisis de correlación de Spearman (R)</i>	56
3.5.6 Modelo de decisión multivariante.	57

4. RESULTADOS	58
4.1 Características clínicas y epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.....	59
4.2 Distribución de las pacientes incluidas en el estudio.....	60
4.2.1 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, causa inmunológica y trombofilia.	60
4.2.2 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, inmunológica y enfermedad autoinmune.	64
4.2.2.1 <i>Síndrome antifosfolípido</i>	64
4.2.2.2 <i>Enfermedad Celiaca</i>	65
4.2.2.3 <i>Alteraciones del tiroides y fallo reproductivo recurrente</i>	68
4.2.3 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, expansión de células NK y NKT-like.	71
4.3 Correlaciones entre la población de NK totales y diferentes variables inmunológicas, trombofílicas y hormonales.....	72
4.4 Estudio de las poblaciones linfocitarias de células NK/NKT-like.	72
4.4.1 Estudio de la población NK a lo largo del ciclo menstrual en controles sanos.	72
4.5 Análisis de las células NK totales, subpoblaciones de células NK y NKT-like de sangre periférica en pacientes con FRR y controles	73
4.5.1 Factores de Riesgo para Fallo Reproductivo Recurrente	74
4.6 Modelo de árbol de decisión para fallo gestacional recurrente.....	75
4.6.1 Modelo de árbol de decisión para pacientes con fallo de implantación recurrente.	78
4.6.2 Modelo de árbol de decisión para pacientes con fallo de implantación recurrente.	79
4.7 Valoración de la seguridad del tratamiento con gammaglobulina intravenosa.	80
4.8 Evolución del porcentaje de células NK totales a lo largo de la gestación	81
4.8.1 Comparación del porcentaje de células NK entre pacientes con AR y FIR en cuatro puntos a lo largo de la gestación.	82
4.9 Efecto clínico del tratamiento con gammaglobulina intravenosa.	83
4.9.1 Tasa de Recién Nacido Vivo en el Grupo de Pacientes con Aborto Recurrente.	83
4.9.2 Tasa de gestación en el grupo de pacientes Fallo de Implantación Recurrente.	84
4.9.2.1 <i>Tasa de gestación en el grupo de pacientes con Fallo de Implantación Recurrente con ovodonación o sin ovodonación.</i>	85
4.9.3 Tasa de Recién Nacido Vivo en el grupo de pacientes con Fallo de Implantación Recurrente.	87
4.9.3.1 <i>Tasa de recién nacido vivo en el grupo de pacientes Fallo de Implantación Recurrente con ovodonación o sin ovodonación.</i>	88
4.9.4 Comparación de la tasa de gestación entre criterio americano y según árbol de decisión en pacientes del grupo FIR.	89

4.9.5	Comparación de la tasa de recién nacido vivo entre criterio americano y árbol de decisión en pacientes del grupo FIR.	90
4.9.6	Comparación de la tasa de recién nacido vivo entre criterio americano y árbol de decisión en pacientes del grupo AR.	91
4.9.7	Distribución de pacientes con AR y FIR en función de la edad y el porcentaje de células NK.	92
4.10	Análisis de regresión logística multivariante.	94
5.	DISCUSIÓN	96
6.	CONCLUSIONES	107
7.	BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXOS		122

RESUMEN

Actualmente la infertilidad constituye un importante problema de Salud Pública y de elevado impacto socio-económico, representando a un 10-20% de las parejas en edad fértil padecen infertilidad en el mundo occidental. El fallo reproductivo recurrente (FRR), comprende dos entidades clínicas como son el aborto recurrente (AR) y el fallo de implantación recurrente (FIR). Múltiples factores pueden estar implicados en la etiología del FRR, entre ellos, factores epidemiológicos, anatómicos, endocrinos, autoinmunes, genéticos e infecciosos. Aun así, cerca de un 50% de los casos de FRR son diagnosticados de causa no filiada, de los cuales, entre un 70-80% de los mismos llevan asociado una alteración inmunológica.

Las células natural killer (NK) desempeñan una importante función en la respuesta inmunológica durante la gestación. Un aumento en el número o en la función de esta población linfocitaria se asocia con problemas en el desarrollo del embarazo. Estos casos asociados con expansión de células NK podrían beneficiarse de una terapia inmunomoduladora con gammaglobulina intravenosa (GGIV).

La edad materna y el número de abortos previos se consideran los dos factores de riesgo principales. En la presente memoria se demuestra que la expansión de células NK circulantes es un factor de riesgo independiente de FRR.

Se presenta un modelo de árbol de decisión clínica en FRR, que permite definir el riesgo de fallo gestacional ulterior en una paciente individual dependiendo de: la edad materna, el porcentaje de células NK totales y del porcentaje células $CD56^+CD16^+$ citotóxicas. Según este árbol, se definen subgrupos de máximo riesgo que serían las mujeres menores de 35 años con un porcentaje de células NK $>24\%$ y mujeres mayores de 35 años con un porcentaje de $CD56^+CD16^+ >13\%$. Este grupo de pacientes constituyen una población de riesgo de pérdida gestacional de probable causa inmunológica.

En un estudio observacional retrospectivo, se ha evaluado el efecto clínico del tratamiento con gammaglobulinas intravenosas sobre la tasa de éxito gestacional en las pacientes con FIR y de recién nacido vivo en mujeres con AR y FRR. La tasa de gestación en pacientes con FIR y expansión de NK fue del 93,8%. La tasa de recién nacido vivo en mujeres con AR y expansión de células NK fue del 96,3% y en mujeres con FIR y expansión de NK fue del 80,0%.

Las gammaglobulinas utilizadas globalmente en el FRR no han demostrado beneficio. Los resultados obtenidos en este trabajo abren por tanto una nueva puerta en el diagnóstico de FRR de causa inmunológica, y establecen nuevas pautas en el uso racional de los medicamentos en esta patología.

ABREVIATURAS

ACA	Anticuerpos anti-cardiolipina
AAS	Ácido acetilsalicílico
AEM	Agencia Europea del Medicamento
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Ang-2	Angioproteína 2
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	Aloficocianina
AR	Aborto recurrente
ASRM	Asociación Americana de Medicina de la Reproducción
Aβ2	Anticuerpo anti- β 2 glicoproteína I
C4	Componente 4 del complemento
CD	Célula dendrítica
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA4	<i>“Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”</i>
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
dNK	Células natural killer deciduales
eNK	Células Natural killer endometriales
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
Fab	Región Variable
Fc	Región constante
FIR	Fallo de implantación recurrente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FoxP3	<i>“Forkhead box P3”</i>
FRR	Fallo reproductivo recurrente
FSC	Tamaño <i>“Forward-scatter”</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
G CSF	Factor estimuladores de colonias de granulocitos
GGIV	Gammaglobulina intravenosa

GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
H	Cadena pesada
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
hGC	Gonadotropina coriónica humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IDO	Indolamino-2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Ig-SF	Superfamilia de las inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
ILT	<i>Ig-like transcript</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	<i>Killer Ig-like Receptors</i>
KLR	<i>Killer cell lectin-like receptor</i>
L	Cadena ligera
LH	Hormona luteinizante
MTHFR	Metilen-tetrahidrofolato reductasa
NCR	Receptor de citotoxicidad natural
NK	Célula natural killer
NKT-like	Célula natural Killer T
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
OxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
PBS	Solución fosfato-salina
PE	Fitoeritrina
PerCP	Proteína peridin-clorofila
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PIBF	Pregesterone-induced blocking factor

pNK	Células natural killer periféricas
RAM	Reacciones adversas medicamentosas
RNV	Recién nacido vivo
ROC	Receiver operating characteristic
SAAF	Síndrome anticueros antifosfolípidos
SDF	Factor derivado de células estromales
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SP	Sangre periférica
SSC	Complejidad “ <i>Side-scatter</i> ”
Tg	Tiroglobulina
TGF	Factor de crecimiento tumoral
tGT	Transglutaminasa
Th	Respuesta T colaboradora “ <i>T helper</i> ”
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPO	Tiroperoxidasa
Treg	Linfocitos T reguladores
TSH	Hormona estimulante del tiroides
uNK	Natural killer uterinas
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

1. INTRODUCCIÓN

Fallo Reproductivo. Conceptos y epidemiología.

1.1 Infertilidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como una “enfermedad del sistema reproductivo caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas”¹. Esta definición ha sido aceptada por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE).

Se estima que en el mundo occidental la prevalencia de la infertilidad es del 10% al 20% de las parejas en edad fértil, si bien dichos porcentajes son meramente orientativos y difícilmente comparables entre distintas poblaciones, dada la dificultad de una estimación real de esta patología². Esto supone que en la actualidad existen aproximadamente más de 70 millones de parejas infértiles en todo el mundo³.

En el caso de España, la prevalencia de la infertilidad/esterilidad se sitúa actualmente entre un 15%-25% de las parejas, lo que corresponde aproximadamente a 800.000 parejas. El 85% de las parejas que intentan una gestación la consiguen en el periodo de un año, el 92% tras dos años de relaciones sexuales y el 93% tras tres años². Los últimos datos publicados en el registro de la SEF señalan que en el año 2010 un total de 25.532 pacientes fueron sometidas a diferentes técnicas de fecundación asistida. Estos datos indican la magnitud del problema a nivel de salud y socioeconómico. Si además estimamos que la media del gasto económico sanitario de cada ciclo de tratamiento de reproducción asistida por pareja se sitúa en torno a los 6.000 a 9.000 euros, y que la media de ciclos realizados es de aproximadamente 3 por pareja (Registro de la SEF: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2.010), hacen de la infertilidad un problema de gran relevancia e impacto a nivel socio-sanitario.

1.2 Fallo Reproductivo Recurrente

Dentro del término fallo reproductivo recurrente (FRR) se engloban dos entidades clínicas bien conocidas, que son: aborto recurrente y fallo de implantación recurrente.

1.2.1 Aborto Recurrente

El aborto recurrente (AR) se define como la pérdida espontánea de dos o más gestaciones antes de completadas las 20 semanas de edad gestacional (18 semanas tras la fecundación) o, si la edad gestacional es desconocida, la pérdida de un embrión/feto de menos 400 g^{1, 4, 5}. El aborto recurrente puede ser primario o secundario. Se denomina primario, a tres o más pérdidas fetales sin embarazos viables previos, y secundario, si ha existido al menos un recién nacido vivo previo, independientemente del número de embarazos perdidos⁶

1.2.2 Fallo de Implantación Recurrente

Actualmente no existe una definición única para esta entidad clínica. La más aprobada define fallo de implantación recurrente (FIR) como la ausencia de implantación tras tres transferencias en las que se hayan transferido al menos dos embriones de buena calidad^{7, 8}

1.3 Etiología

1.3.1 Causas de aborto recurrente en la mujer.

La historia reproductiva previa es un factor predictivo independiente de futuras complicaciones durante el embarazo⁹. El riesgo de futuros abortos aumenta después de cada aborto. El principal factor pronóstico de riesgo de aborto es la edad avanzada de la madre¹⁰. Asimismo, el nacimiento de un hijo no descarta la posibilidad de poder presentar abortos recurrentes.

1.3.1.1 Factores epidemiológicos del aborto recurrente.

La edad de la madre y el número de abortos previos son los dos factores de riesgo independientes que más influyen en la aparición de futuros abortos. Una edad materna avanzada (≥ 35 años) se asocia con un declive en la calidad y cantidad de ovocitos⁹. Estudios prospectivos señalan que el riesgo de sufrir una nueva pérdida fetal está relacionado con la edad materna (Tabla 1). La edad paterna avanzada también ha sido identificada como factor de riesgo de abortos¹¹. El mayor riesgo de aborto se encuentra en parejas donde la mujer tiene ≥ 35 años y el hombre ≥ 40 años¹¹

Edad Materna	% Riesgo de Pérdida Fetal
12-19 años	13%
20-24 años	11%
25-29 años	12%
30-34 años	15%
35-39 años	25%
40-44 años	51%
≥ 45 años	93%

Tabla 1. Relación entre la edad materna y el riesgo de sufrir pérdida fetal. Nybo Andersen, 2000. ⁹

El FRR es uno de las patologías más complejas en obstetricia ¹². Se han descrito múltiples etiologías, como se muestra en la Tabla 2. Aun así, en más de la mitad de los casos no se identifica su causa (Figura 1). Dentro de este grupo de causa no filiada, aproximadamente un 80% de los casos se asocia con factores inmunológicos ¹³.

Causas de Fallo Reproductivo Recurrente	
<u>Etiología</u>	<u>Enfermedad</u>
Anatómica	Miomas Anomalías Uterinas Fibrosis endometrial
Endocrina	Hipertiroidismo Hipotiroidismo Diabetes Mellitus
Hematológica	Trombofilias (hereditarias/adquiridas)
Autoinmune	Síndrome Antifosfolípido Tiroiditis Autoinmune Enfermedad Celiaca
Alloinmune	Incompatibilidad Rh Incompatibilidad ABO
Genética	Translocación Inversión Polimorfismos genéticos (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β)
Nutricional	Deficiencia de Vitamina B12 Deficiencia de Folato
Infecciosa	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Toxoplasmosis</i> <i>Cytomegalovirus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Tabla. 2. Causas de fallo reproductivo recurrente. Tabla modificada de Kwak-Kim, J, 2009. ¹²

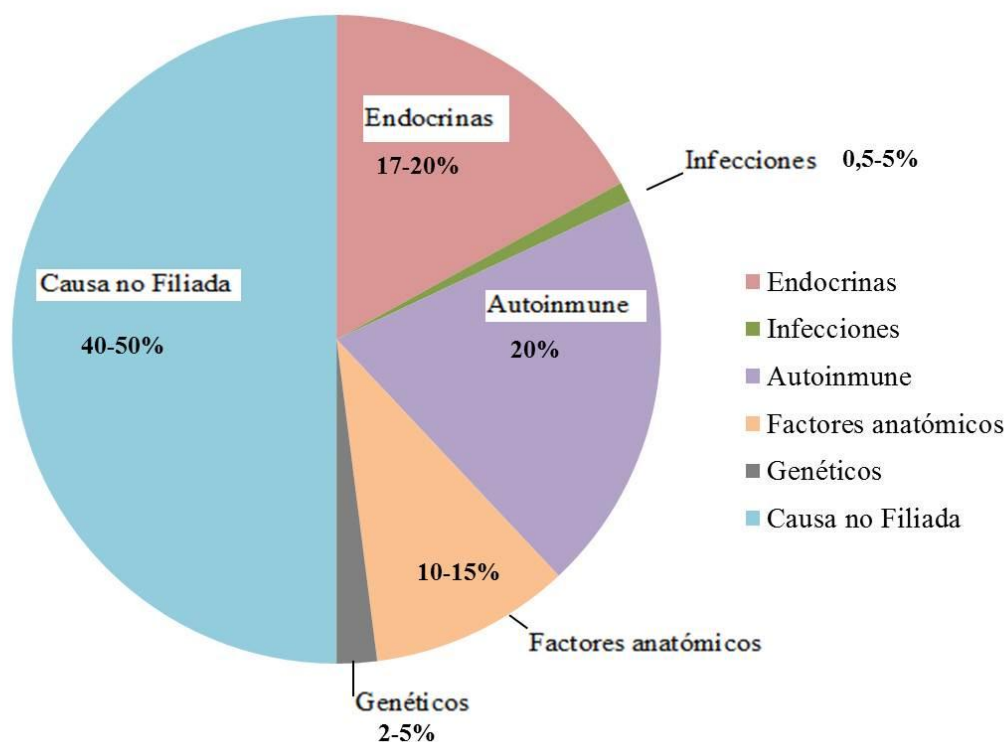


Figura.1. Etiología de fallo reproductivo recurrente. Imagen modificada de Ford et al, 2009 ¹⁴.

1.3.1.2 Factores Inmunológicos en el fallo reproductivo recurrente. Expansión de células Natural Killer.

Las células natural killer (NK) desempeñan una importante función en la respuesta inmunológica durante la gestación, y cambios en el número o en la función de esta población linfocitaria se asocian con problemas en el desarrollo del embarazo. ¹³. La relación entre las células NK periféricas (pNK) y el fallo reproductivo es una de las áreas más interesantes y controvertidas dentro de la medicina reproductiva ¹⁵.

Varios estudios han demostrado que mujeres con abortos recurrentes presentan un elevado número de NK ^{16, 17} y un aumento de su actividad tanto en la periferia como en el endometrio con respecto a mujeres fértiles sanas. Fukui et al demostraron que los porcentajes de células NK CD56^{dim}CD16⁺ en sangre periférica (SP) y en el endometrio son más altos y los porcentajes de CD56^{Bright} más bajos en mujeres con fallo reproductivo que en el grupo de éxitos gestacionales ¹⁸.

Este aumento se ha observado principalmente en abortos recurrentes de tipo primario en los que todas las gestaciones han terminado en aborto y menor en el tipo secundario, en el cual han tenido éxito gestacional seguido de abortos ¹⁹

Por otra parte, existen estudios como el de Vujisic et al. en los que no se encuentra ninguna asociación entre pNK e infertilidad ²⁰. En el mismo sentido encontramos que estudios como los realizados por Lee-Batalille en 2005 demuestran una relación entre las células NK uterinas (uNK) e infertilidad ²¹ y por el contrario Matteo no encuentran ninguna diferencia entre ambos grupos de estudio ²².

La diferencia de resultados obtenidos entre los diferentes grupos puede deberse a distintos criterios de inclusión de las pacientes, los protocolos de laboratorio, la metodología de análisis y el tamaño de la muestra ²³

1.4 El ciclo menstrual

La regulación hormonal del ciclo menstrual prepara al endometrio para la implantación si ocurre fecundación.

La ventana de implantación, días 7-10 después del pico de LH, representa el periodo en el cual es más factible que ocurra la implantación ²⁴. En este momento el endometrio sufre una serie de cambios significativos los cuales aumentan su receptividad hacia el embrión. Un aumento de la secreción de LH desde la zona anterior de la pituitaria, causa la liberación del óvulo desde el folículo maduro ²⁴. Bajo el efecto de los estrógenos y la progesterona, el endometrio prolifera y sufre cambios vasculares.

1.4.1 Menstruación (días 1-4)

La ausencia de implantación determina el descenso de producción de hormonas por parte del cuerpo lúteo, retirando el apoyo al endometrio. La túnica media de las arterias espirales se contrae, se suspende el aporte sanguíneo al tejido, provocando un estado necrótico y como consecuencia de ello el endometrio se desprende junto con la sangre, no se coagula debido a un efecto fibrinolítico local ²⁵.

1.4.2 Fase proliferativa (días 5-13)

La liberación de FSH desde la parte anterior de la pituitaria causa el crecimiento folicular, el cual conlleva la secreción de estradiol, esta hormona causa el desarrollo, proliferación del endometrio, con una intensa mitosis en el estroma y epitelio glandular. En los primeros días de esta fase la superficie del epitelio se transforma convirtiéndose en endotelio. La elongación de las arterias espirales y el incremento del número de glándulas ocurren en este periodo ²⁵.

1.4.3 Ovulación/Fase secretora (días 14-28)

El día 14 el pico de LH causa la ovulación, los restos de folículo desde la liberación del óvulo se transforman en cuerpo lúteo y continua produciendo estradiol y mayor cantidad de progesterona. Esto estimula al endometrio y lo convierte en “secretor”, aumentando el número de glándulas y aumentando el tamaño de sus células. Las glándulas liberan un material rico en glicógeno. El tejido endometrial se observa más edematoso. Si la fecundación no ocurre al final de esta fase el cuerpo lúteo falla y disminuye la producción de esteroides, dando paso a la menstruación ²⁵.

1.5 Inmunología del embarazo

Desde los inicios de la Inmunología como disciplina, uno de los grandes interrogantes que se plantea es el por qué el embrión no es rechazado por el sistema inmunológico de la madre. La gestación constituye un estado transitorio de equilibrio en el que el sistema inmunitario de la madre debe, por una parte, tolerar los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) paternos; y por otra, mantener una respuesta efectora adecuada de protección frente a agentes patógenos. A su vez, el feto desarrolla mecanismos de protección frente al sistema inmunitario materno.

A continuación se describe el conjunto de procesos inmunológicos complejos que actúan de forma integrada para favorecer el éxito gestacional.

1.5.1 Anatomía de la interfase materno-fetal. La placenta

El desarrollo de la placenta por parte del embrión depende de la implantación del mismo. La implantación ocurre en torno al sexto día tras la fecundación. Durante la misma se produce la diferenciación de la células del estroma a células deciduales (decidualización) ²⁶, al mismo tiempo que el trofoblasto fetal invade el estroma

endometrial (decidua), provocando la rotura de los vasos sanguíneos maternos y la formación de cavidades lacunares que se llenan de sangre materna, fundamentales para el aporte adecuado de nutrientes y oxígeno al embrión en los primeros días y para generar la circulación útero-placentaria primitiva. El trofoblasto pronto origina dos capas celulares, una externa, o sincitiotrofoblasto, encargada de erosionar el endometrio, y otra interna, o citotrofoblasto, con capacidad de división, a través del cual se produce el intercambio gaseoso y de nutrientes ²⁷. Por tanto, el embrión o feto no entra en contacto directo con los tejidos maternos, sino que existe una interfase entre ambos generada por el trofoblasto, a través de la cual se realiza el reconocimiento de antígenos fetales y se desarrollan mecanismos efectores y reguladores inmunitarios ²⁸. (Figura 2)

Las principales funciones de la placenta pueden dividirse en cuatro categorías: transporte, metabolismo, protección y endocrina. La placenta actúa proporcionando oxígeno, agua, carbohidratos, aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes al feto, mientras elimina dióxido de carbono y otros productos tóxicos. Esto puede ayudar a proteger al feto de ciertas moléculas xenobióticas, infecciones, etc. A su vez, también libera hormonas hacia la circulación materna como a la fetal, lo que afecta al desarrollo del embarazo, al crecimiento fetal y al metabolismo entre otros. Muchas funciones de la placenta varían a lo largo de la gestación ²⁹.

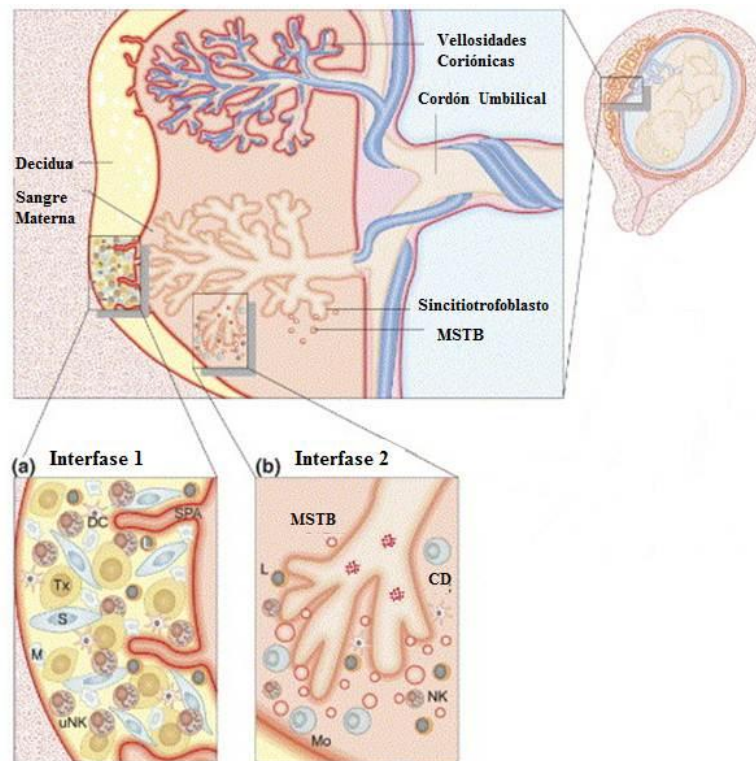


Figura.2. Durante la gestación existen dos interfaces que se encuentran separadas espacial y temporalmente. a) En el embarazo temprano la interfase 1 comprende la interacción entre las células del sistema inmunológico materno presentes en la decidua (NK uterinas (uNK), linfocitos T (L), macrófagos (M) y células dendríticas (CD) junto con el citotrofoblasto extravelositario invasivo (Tx) y las células estromales (S) y arterias espirales (SPA). Esta interfase desaparece completamente en el tercer trimestre. b) La segunda interfase se produce entre las células del sistema inmunológico materno circulantes y el sincitiotrofoblasto. Está presente desde la formación de la circulación uteroplacentaria hasta el final de la gestación. El sincitiotrofoblasto libera micro partículas de sincitiotrofoblasto a las circulación como parte del proceso de renovación y reparación de la superficie placentaria (MSTB). Figura. modificada de Sargent et al, 2006³⁰

1.5.2 Mecanismos de hiporrespuesta frente a aloantígenos fetales y de evasión fetal del sistema inmunitario materno.

La tolerancia materna frente a aloantígenos fetales es un proceso complejo, en el que concurren diversos mecanismos aún no bien conocidos, aunque conceptualmente se pueden considerar de dos categorías: A) los mecanismos de evasión fetal del sistema inmunitario de la madre como son: 1) la expresión/represión de moléculas HLA por el trofoblasto³¹⁻³⁵; 2) la interacción Fas-FasL,^{31, 34}; 3) la depleción de triptófano fetal^{34, 36}; y 4) la expresión de moléculas coestimuladoras inhibitoras^{37, 38} y los mecanismos de inducción de hiporrespuesta en las células efectoras maternas³⁹.

1.5.3 Microquimerismo.

Se ha demostrado la presencia de células fetales en la circulación materna durante el embarazo y su persistencia tras varios años del parto ⁴⁰. Se había especulado que el ADN fetal provenía de las células del trofoblasto. Varios autores han puesto de manifiesto que las células hematopoyéticas fetales entran en la circulación materna y persisten varios años tras el nacimiento ^{41, 42}. La presencia de microquimerismo se observa desde las primeras etapas del embarazo y podría ser responsable de inducir un estado de tolerancia en la madre frente a los antígenos de origen paterno ^{43, 44}. Estudios recientes han observado que la presencia de células fetales en la sangre materna aumenta con el desarrollo de la gestación, siendo mayor en el tercer trimestre ⁴⁵.

1.6 Potenciación de las células inmunorreguladoras maternas.

Durante el embarazo, distintas subpoblaciones celulares desempeñan funciones fundamentales para favorecer la tolerancia materna hacia el feto.

1.6.1 Células Dendríticas

Las células dendríticas (CD) poseen la capacidad dual de presentar antígenos e inducir una respuesta inmunitaria primaria, o bien de inducir tolerancia frente al mismo, regulando la inmunidad mediada por los linfocitos T. Su contribución a la diferenciación de células T reguladoras (Treg), que a su vez actúan sobre las CD bidireccionalmente y son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T efectoros ⁴⁶⁻⁴⁸, podría explicar en parte el papel de las CD en la inducción de la tolerancia inmunológica.

Durante la implantación, las CD son reclutadas en la interfase materno fetal, iniciando y coordinando la respuesta inmunitaria innata y adquirida.

1.6.2 Células T gamma/delta (T $\gamma\delta$)

Los linfocitos T $\gamma\delta$ ejercen mecanismos efectoros específicos en combinación con funciones inmunorreguladoras. Se han aislado en la interfase materno-fetal de manera constitutiva, lo que apunta a un posible papel de estas células en la gestación ⁴⁹. Las células T $\gamma\delta$ durante el embarazo constituyen una pequeña fracción de los linfocitos

residentes en el epitelio decidual y expresan el receptor $V\delta 1^+$ mientras que los linfocitos $T\gamma\delta$ circulantes presentan un receptor $V\delta 2^+$ con marcadores de superficie similares a los linfocitos $T\alpha\beta$ circulantes⁵⁰. Los linfocitos $T\gamma\delta$ comprenden aproximadamente la mitad de la población de células T de la decidua, activados tienen la capacidad de proteger la unidad materno-fetal frente al estrés, manifestado principalmente como infecciones o tumores^{51, 52}. Se ha observado que en mujeres embarazadas sanas el número de células $T\gamma\delta V\delta 1^+$ era mayor con respecto a mujeres con abortos recurrentes, en las que predominan los linfocitos $T\gamma\delta V\delta 2^+$ circulantes^{53, 54}. Las células $T\gamma\delta$ que reconocen un grupo de ligandos y antígenos sin restricciones por el CMH, podrían desempeñar un papel clave en el reconocimiento inmunológico del embarazo. Los linfocitos $T V\delta 1^+$ de la decidua pueden reconocer antígenos relacionados al trofoblasto y participar, entre otros procesos, en el control de la invasión del trofoblasto durante la placentación. Además, los linfocitos $T\gamma\delta V\delta 1^+$ expresan varios tipos de moléculas con actividad citolítica, como la perforina, las granzimas A y B y FasL⁵⁵. Su capacidad citotóxica es de gran importancia en la interfase materno fetal, ya que se considera que los linfocitos $T\gamma\delta$ protegen la unidad materno-fetal frente a patógenos, controlan la invasión uterina por el trofoblasto extraveloso y participan en la tolerancia inmunológica de la madre hacia el feto, alterando el balance de citoquinas para crear un entorno favorable al feto. Los linfocitos $T\gamma\delta$ a través de la producción de las citoquinas interleuquina-10 (IL-10) y/o $TGF-\beta$ ^{56, 57} podrían actuar como células reguladoras directa o indirectamente, induciendo la diferenciación de linfocitos $CD4^+$ en células reguladoras^{58, 59}.

1.6.3 Células T reguladoras

Como se ha mencionado previamente, las células Treg maternas se reclutan en la decidua y parecen desempeñar una función fundamental en la tolerancia materna y en el mantenimiento de la gestación.

Por otra parte, un número importante de células maternas atraviesan la placenta hacia los ganglios linfáticos fetales, induciendo la producción de Treg fetales, que a su vez suprimen la respuesta inmunitaria fetal frente a las células maternas y que persisten por lo menos hasta la edad adulta⁶⁰. El ganglio linfático fetal produce gran cantidad de

TGF- β , que junto con la estimulación antigénica y la IL-2, inducen la expresión de FoxP3 y la generación de Treg propias de los antígenos maternos⁶¹.

Desde el inicio del embarazo normal se observa un aumento de Treg⁶²⁻⁶⁵, con un pico en el segundo trimestre y disminución de esta población en el postparto. El porcentaje de Treg es mayor en la decidua que en sangre periférica^{66, 67}. Este aumento de Treg al comienzo del embarazo podría ser importante para mantener la tolerancia materno-fetal⁶⁸. Las Treg pueden llegar a reconocer péptidos provenientes de proteínas maternas no heredadas presentadas por moléculas HLA clase II heredadas. Estas Treg específicas para el reconocimiento de antígenos maternos pueden bloquear la proliferación de células T efectoras y evitar la lisis de células maternas que han cruzado la barrera placentaria sin ser eliminadas por las células NK del feto. Uno de los resultados de esta acción por parte de las Treg es el microquimerismo materno en el feto aproximadamente 10 veces mayor que el descrito en adultos⁶⁹. La expresión constitutiva de CTLA-4 en los linfocitos CD4⁺ se limita principalmente a los Treg deciduales, que podría contribuir a suprimir la respuesta inmunitaria materna hacia el feto, como se ha mencionado previamente y favorece la expresión de indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) en las CD que tienen un papel importante en el éxito del embarazo⁷⁰.

1.6.4 Th1-Th2 en la gestación

Clásicamente se ha descrito que durante el embarazo normal prevalece la respuesta materna de tipo Th2 sobre la Th1, caracterizada por un patrón de producción de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que favorecen el desarrollo e invasión del trofoblasto⁷¹. El perfil de citoquinas de Th1 proinflamatorias (IL-2, IFN- γ factor de necrosis tumoral (TNF)- α y β) se ha asociado con el rechazo del embrión⁷². Sin embargo, las citoquinas Th1 son importantes durante la implantación. Además, las citoquinas tipo Th1, como el IFN- γ pueden tener efectos inmunorreguladores, favorecen el desarrollo de arterias espirales uterinas y la maduración de las células uNK. En paralelo, durante la gestación se potencia la diferenciación de las células reguladoras, en concreto, de los linfocitos Treg naturales o inducidos, productores de citoquinas inmunorreguladoras IL-10 y TGF- β que se expanden en sangre periférica y se reclutan en la interfase materno-fetal⁷³. Estas Treg estarían inhibiendo la diferenciación Th1, Th2 y Th17.

1.6.5 Células Th17

Los linfocitos Th17 pueden influir en la tolerancia materna al feto ⁷⁴⁻⁷⁶. Las IL-1 β y IL-16 son esenciales para la diferenciación de los linfocitos Th17 ⁷⁶. Los linfocitos Th17 producen las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-16, IL-22, IL-23 y TNF- α ⁷⁷, involucradas en los procesos de inflamación, autoinmunidad y en el rechazo inmunológico en el trasplante ⁷⁸. Estos datos podrían sugerir que los linfocitos Th17 deben reducirse durante el embarazo para evitar el rechazo del feto. En concordancia con esta línea, se ha descrito que los linfocitos Th17 se encuentran prácticamente ausentes en la decidua, asociado con una expansión de Treg. Por el contrario, en sangre periférica y en la decidua de mujeres con abortos recurrentes se ha observado un aumento de células Th17 y una relación inversa entre los porcentajes de los linfocitos Th17 y Treg ⁷⁹.

1.6.6 Linfocitos B

Durante la gestación se produce una disminución de los linfocitos B que reconocen antígenos paternos ⁸⁰, mecanismo importante en la tolerancia del feto y en el éxito del embarazo ⁸¹. Otro mecanismo inductor de tolerancia es la disminución de la producción de linfocitos pro-B y otras subpoblaciones precursoras B en la médula ósea materna. Estos cambios parecen ser dependientes de los altos niveles de estrógenos que se producen durante la gestación ⁸².

1.7 Células Natural Killer

Entre 1974 y 1977 Cantor, Wigzell y Playfair describieron una nueva población linfocitaria. Fueron denominadas como linfocitos grandes granulares ^{83, 84}, más conocidas como células natural killer, son linfocitos grandes que circulan en la sangre ⁸⁵, aunque también se pueden encontrar en tejidos tanto linfoides como no linfoides incluidos ganglios, timo, amígdalas, bazo y útero ⁸⁶. Actúan frente a infecciones causadas por virus, bacterias y parásitos ⁸⁴, también desempeñan un importante papel en la protección frente a células tumorales ⁸⁷.

Las células NK se desarrollan dentro del microambiente de la médula ósea a partir de células progenitoras hematopoyéticas, cuyo fenotipo sería CD34⁺Lin⁻Flt3⁺c-kit⁺ ^{85, 88} en este proceso se ha identificado a IL-15 como un factor crucial para el desarrollo de células NK. Otros factores como Flt3L y c-kitL inducen una rápida expansión de las células hematopoyéticas y a su vez aumenta la capacidad de respuesta a IL-15 ⁸⁸. Por

tanto, el desarrollo de células NK podría dividirse en 2 fases: la primera de ellas consistiría una célula progenitora ($CD34^+$, Lin^-) responde a las señales de los factores de crecimiento Flt3L y c-kitL, pasando a una célula precursora de NK intermedia, la cual ha adquirido la expresión de IL-15R. En la segunda fase esta célula precursora intermedia en presencia de IL-15 alcanza un estado de maduración con un fenotipo característico $CD56^{Bright}$ ⁸⁵. (Figura 3).

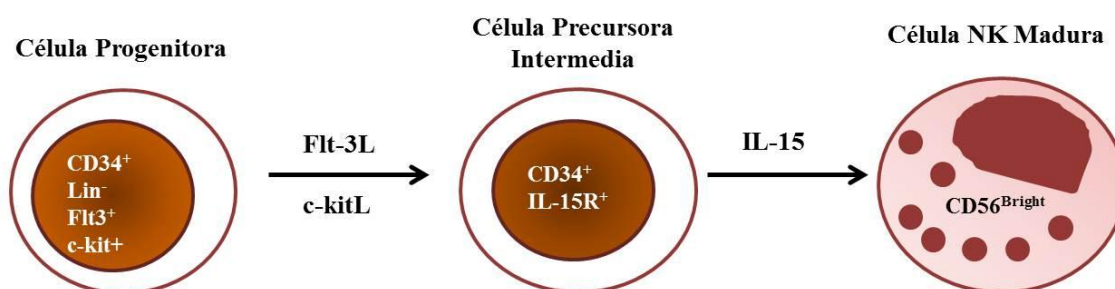


Figura. 3. Proceso de diferenciación de las células NK. Imagen modificada de Cooper et al, 2001 ⁸⁵

El fenotipo predominante en las células NK se define por la expresión de los siguientes marcadores de superficie:

- $CD16$ (o $Fc\gamma RIII$ receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de anticuerpos)
- $CD56$ (o N-CAM molécula de adhesión de las células nerviosas).

Así en sangre periférica, podemos distinguir dos subpoblaciones, $CD56^{dim} CD16^+$ y $CD56^{bright} CD16^-$. Estas dos poblaciones tienen distintas funciones: las NK $CD56^{dim} CD16^+$, se especializan en su función citotóxica, mientras que las NK $CD56^{bright} CD16^-$ tienen aumentada su capacidad secretora siendo la principal fuente de producción de citoquinas ^{85, 87} (Figura4).

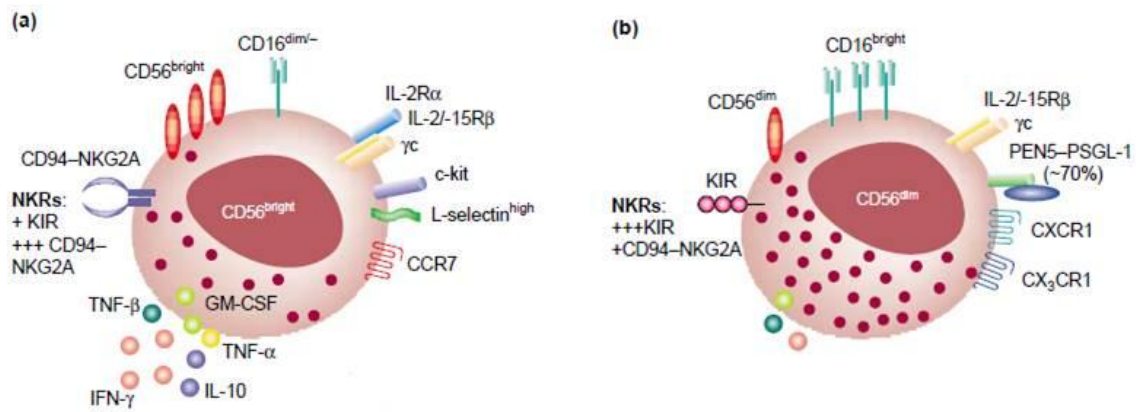


Figura.4. Subpoblaciones de células NK periféricas. a) CD56^{bright}, b) CD56^{dim}. Imagen modificada de Cooper et al, 2001⁸⁵

1.7.1 Receptores de células NK

La respuesta inmune mediada por las células NK está regulada de una forma muy precisa por el resultado final entre señales inhibitoras y activadoras, enviadas al interior celular por receptores de superficie específicos.

La gran mayoría de estos receptores pertenecen a dos grandes superfamilias estructuralmente diferenciadas: la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF) y la superfamilia de las lectinas dependientes de calcio (tipo C) estos receptores son denominados KLR (Killer cell Lectin-like Receptor)^{89, 90}

Los receptores de ambas familias comparten características estructurales que les proporcionan la capacidad de actuar como activadores o inhibidores. Así, los receptores inhibidores contienen largos segmentos citoplasmáticos con motivos inhibitorios o ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), mientras que los receptores activadores presentan un segmento citoplasmático corto y un residuo cargado positivamente en el segmento transmembrana, que permite su asociación a moléculas adaptadoras que contiene motivos activadores o ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif).^{89, 90}.

1.7.1.1 Receptores específicos de las moléculas de HLA de clase I

Dentro de la Ig-SF están los KIR (Killer Ig-like Receptors), que se clasifican de acuerdo al número de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (2D, 3D), y las moléculas denominadas ILT (Ig-like Transcript) que presentan 4 de estos dominios. Existen al menos 5 receptores KIR inhibidores y 3 activadores, específicos para diferentes alelos de las moléculas HLA-A,B y C ⁹⁰.

En la familia de tipo KLR encontramos un receptor de tipo inhibidor es el heterodímero CD94/NKG2A, el cual reconoce la molécula de HLA de clase I no clásica HLA-E ⁸⁹.

1.7.1.2 Receptores no específicos de moléculas de HLA de clase I o de ligando desconocido

En los seres humanos, se ha descrito que moléculas como los receptores de matriz extracelular (fibronectina y colágeno), CD69, CD44 o CD2 son capaces de inducir la función citotóxica de las células NK o desencadenar la activación de tirosinquinazas intracelulares tras el entrecruzamiento con anticuerpos específicos. Estas moléculas, sin embargo, desempeñan otras funciones en las células y su expresión no está restringida a las células NK. ⁸⁹

Actualmente, se conocen 5 receptores expresados exclusiva o mayoritariamente en las células NK, que funcionan como receptores activadores y son los denominados receptores de citotoxicidad natural (NCR), la molécula de tipo lectina NKG2D y CD16, que es el receptor responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

1.7.1.3 Receptores de citotoxicidad natural

Los receptores de citotoxicidad natural (NCR) son los principales responsables de la citotoxicidad natural. NKp30 y NKp46 son expresados en células NK en reposo y activadas ⁹¹⁻⁹³ y NKp44 sólo en células NK activadas ^{93, 94}. Las tres moléculas pertenecen a la Ig-SF y se unen a moléculas transductoras de señal como CD3 ζ y Fc ϵ RI γ en el caso de NKp46 ⁹², CD3 ζ en el caso de NKp30 ⁹¹ y DAP12 en el caso de NKp44 ⁹⁴. Las moléculas NKp46 y NKp44 son específicas para hemaglutininas de los virus *Influenza* y *Sendai* ^{92, 94}. Por el contrario NKp30 ha sido involucrado en la lisis de células dendríticas autólogas inmaduras ⁹¹.

1.7.1.4 NKG2D

NKG2D no forma heterodímeros con CD94, expresándose como un homodímero asociado a una subunidad adaptadora de la señalización denominada DAP10. NKG2D es específico para unas moléculas estrechamente relacionadas con el HLA de clase I, denominadas MICA y MICB. La expresión de estas moléculas es inducida en condiciones de estrés y en diferentes tumores epiteliales, incluyendo tumores de ovario, riñón, colon o pulmón. La unión a los ligandos implica la fosforilación de la subunidad DAP10, y el reclutamiento de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), lo que induce las rutas de activación celular.^{89, 90}

1.7.1.5 CD16 (*FcγRIIIA*)

Es específico para la porción Fc de la Ig y su unión a las IgG que recubren las células extrañas implica la lisis de estas por citotoxicidad dependiente de anticuerpo. CD16 existe como un complejo oligomérico formado por una cadena α (CD16) de unión a la Fc, unida a homodímeros o heterodímeros de las subunidades CD3 ζ y Fc ϵ RI γ . Estas cadenas presentan motivos ITAM que llegan a ser fosforilados tras la unión específica del ligando, induciendo así las rutas de activación celular⁸⁹

1.7.2 Células NK uterinas

La presencia de células granuladas en el tejido endometrial de los humanos fue descrita en 1920. En los años 80 descubrió que estas células eran positivas para el antígeno pan-leucocitario CD45 y más tarde para CD56, lo que confirma su fenotipo de célula NK⁹⁵.

El término de células NK uterinas se utiliza en la literatura indistintamente sin diferenciar entre endometriales (eNK) (están presentes durante el ciclo menstrual) y deciduales (dNK) (presentes en la decidua durante el embarazo)⁸⁷.

1.7.2.1 NK endometriales

Están presentes en el estroma, particularmente alrededor de las glándulas y vasos ya sea de manera individual o formando agregados⁹⁶. El número de NK endometriales fluctúa a lo largo del ciclo menstrual, siendo bajo durante la fase proliferativa, después de la ovulación su número aumenta de manera drástica alcanzando un pico entre la fase secretora media y tardía⁹⁶. Un dato a favor de la proliferación in situ de las NK

endometriales es la expresión del marcador Ki67 asociado a proliferación nuclear durante la fase secretora^{86, 87, 96, 97}. Este aumento en la fase post-ovulatoria es esencial para el éxito gestacional⁹⁸⁻¹⁰⁰. Fenotípicamente se podrían describir como CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻, CD94⁺, CD9⁺, CD57⁻, HLA-DR⁺, CD69⁺, CD158b⁺, NKB1⁺ y L-selectina⁻. Al contrario de lo que sucede con las NK periféricas la expresión de CD56 es intermedia^{86, 87}. Lo que impide hacer la misma clasificación que en el caso de las NK periféricas. Esto hace de las eNK una única población, que sin ser idénticas a las NK periféricas comparte propiedades con ellas⁸⁷.

1.7.2.2 NK deciduales

Con un fenotipo CD56^{bright} CD16⁻, las dNK son similares a la subpoblación CD56^{bright} CD16⁻ de las NK periféricas en su expresión de receptores de citoquinas; sin embargo dNK expresan altos niveles de CXCR3 e intermedios de CXCR4, mientras que las NK periféricas expresan más niveles de CXCR4 y menos de CXCR3^{87, 101, 102}. Por otra parte, son similares a las eNK en su expresión de receptores KIR y en su contenido granular¹⁰³. Estudios de expresión génica han puesto de manifiesto que las dNK podrían ser consideradas una única población, ya que existen genes tales como CD9, CD151 que son expresados exclusivamente por dNK¹⁰⁴ en la Tabla 3 y Figura 5 se muestran las diferencias entre pNK CD56^{Bright} y dNK.

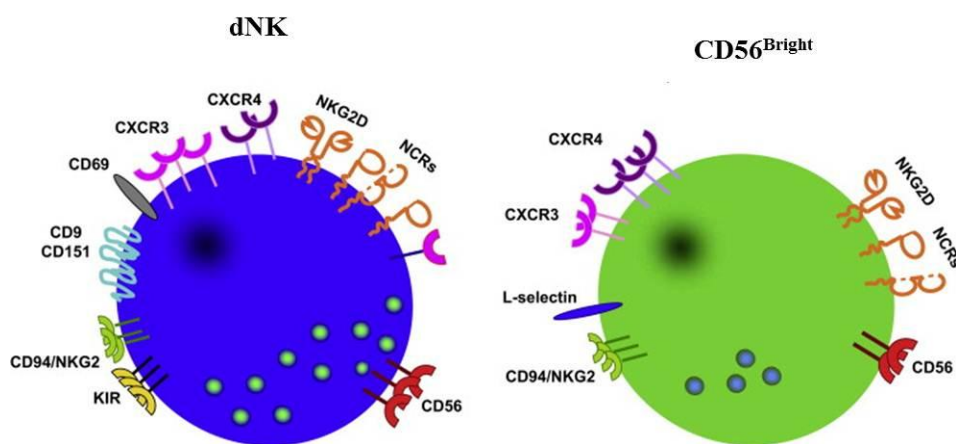


Figura.5. Diferencias entre células NK deciduales (dNK) y NK periféricas CD56^{Bright}. Estas subpoblaciones presentan diferencias en la expresión de diferentes moléculas incluyendo receptores de membrana, moléculas de adhesión y proteínas secretadas. Imagen modificada de Manaster et al , 2008¹⁰³

Comparación entre dNK y CD56 ^{Bright} periféricas		
	dNK	CD56 ^{Bright} periféricas
Marcadores Fenotípicos		
CD56	+++	+++
CD16	-	-
NKG2D	+	+
NKp46	+	+
NKp44	+	-
NKp30	+	+
KIR	++	-
CD9	++	-
CD151	+	-
CD62L (L-selectina)	-	+
CD94/NKG2	+++	+++
Citoquinas		
Perforina	+++	+
Granzima A y B	+++	+
Función		
Citotóxica	Baja	Baja
Secreción de quimiocinas	+++	+

Tabla. 3. Comparación entre dNK y CD56^{Bright} a nivel fenotípico y funcional. Tabla modificada de Moffet-King, 2002 y Manaster, 2008. ^{102, 103}

Las funciones fundamentales de las células dNK de en el desarrollo del embarazo son:

- Control de la invasión del trofoblasto

En las primeras fases de la gestación las células dNK juegan un importante papel en la estimulación del crecimiento, diferenciación e invasión del trofoblasto ^{95, 101}. Esto ocurre vía secreción de citoquinas y quimiocinas por parte de las dNK. Sin embargo, la presencia de dNK en el primer y segundo trimestre del embarazo y su asociación con las células trofoblásticas, sugieren que podrían regular la invasión del trofoblasto y la placentación ⁹⁵. Las células del trofoblasto carecen de la expresión de HLA-A,-B y clase II pero expresan HLA clase I incluyendo HLA-C (primer trimestre) HLA-E, HLA-G ¹⁰¹. La falta citotoxicidad de las dNK frente a las células del trofoblasto se debe a la presencia de HLA-I en el trofoblasto extraveloso ⁹⁵.

Una vez interaccionan las dNK con las células del trofoblasto se liberan una gran cantidad de citoquinas tales como IL-8, VEGF, SDF-1 y CXCL10. Durante esta interacción la activación de dNK es mediada por los receptores NCR y NKG2D ¹⁰¹. Por otro lado Ang2, TNF- α , IFN- γ , y TGF- β , liberadas por parte de

las dNK se ha demostrado que inhiben la invasión del trofoblasto ^{95, 103}. Las dNK desempeñan un importante papel promoviendo y regulando los eventos que llevan a la formación y remodelación del trofoblasto y otros tejidos placentarios ¹⁰¹.

- Angiogénesis

La angiogénesis implica la expansión de vasos pre-existentes a través de la proliferación de las células endoteliales y su consiguiente migración y diferenciación hacia nuevos capilares ¹⁰⁵. Las dNK juegan un papel fundamental en la transformación de las arterias espirales. Los cambios estructurales que sufren las arterias espirales ocurren antes de la interacción celular con el trofoblasto, pero en presencia de las dNK. La secreción de VEGF, IFN- γ y Ang-2 están asociados con el control de la actividad citotóxica de este tipo celular, proporcionando una unión entre su función pro-angiogénica e inmunomoduladora dentro del microambiente uterino ^{95, 105}. El número de células NK deciduales disminuye, después de las 20 semanas de gestación cuando los cambios vasculares están completos ⁹⁵ (Figura 6)

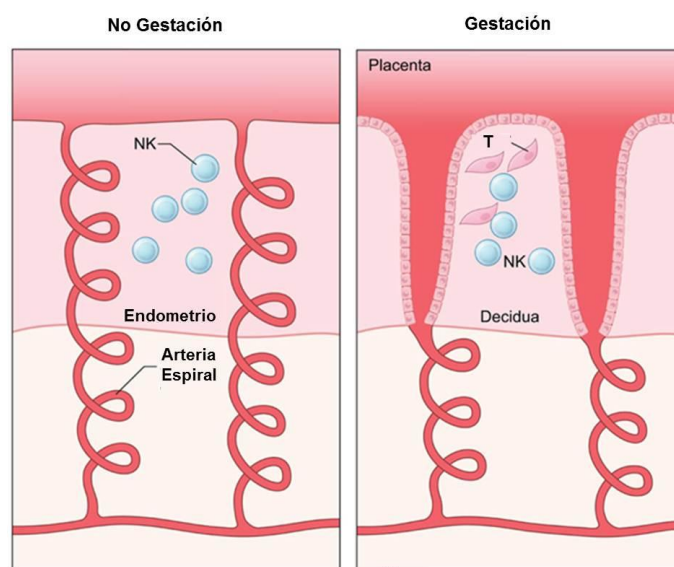


Figura. 6. Remodelación de arterias espirales. Las células NK son abundantes en la fase secretora del ciclo menstrual en el endometrio no gestante. En las primeras fases del embarazo las células del trofoblasto (T) en contacto con las NK de la decidua, contribuyen a la remodelación de las arterias espirales hacia arterias uteroplacentarias, a través de las cuales el flujo sanguíneo hacia el feto aumenta. Imagen modificada de Rajagopalan et al 2012 ¹⁰⁶

Los mecanismos que controlan la acumulación de células NK $CD56^{\text{Bright}}CD16^-$ en la decidua son hasta el momento desconocidos. Existen dos teorías que podrían explicarlo:

- Migración de células NK hacia el útero

La gran cantidad de células NK que pueblan la decidua sugieren el reclutamiento de células NK desde otros órganos o desde la sangre. Estudios como los realizados por Hanna o Moffett-King sugieren la migración de células NK desde la sangre a la decidua ^{102, 107}.

Keskin et al. sugieren que las células dNK podrían derivar de la subpoblación de células pNK $CD56^{\text{dim}}CD16^+$, que migraría hacia la decidua y una vez allí se diferenciaría localmente hacia dNK por el efecto de $TGF\beta$ entre otros factores ¹⁰⁸. Sin embargo, otros estudios apoyan la hipótesis de que las dNK podrían originarse a partir de la subpoblación de pNK $CD56^{\text{Bright}}CD16^-$ ^{65, 87, 95, 96, 109, 110}.

CXCL12 desempeña una importante función en la migración de las células NK hacia la decidua, pNK $CD56^{\text{Bright}}CD16^-$ y las células dNK expresan altos niveles de ambos receptores CXCR3 y CXCR4. Sin embargo, sólo CXCR4 parece ser esencial para la migración de células $CD56^{\text{Bright}}CD16^-$ por su interacción con su ligando CXCL12, expresado en los trofoblastos invasivos ¹¹¹ (Figura7).

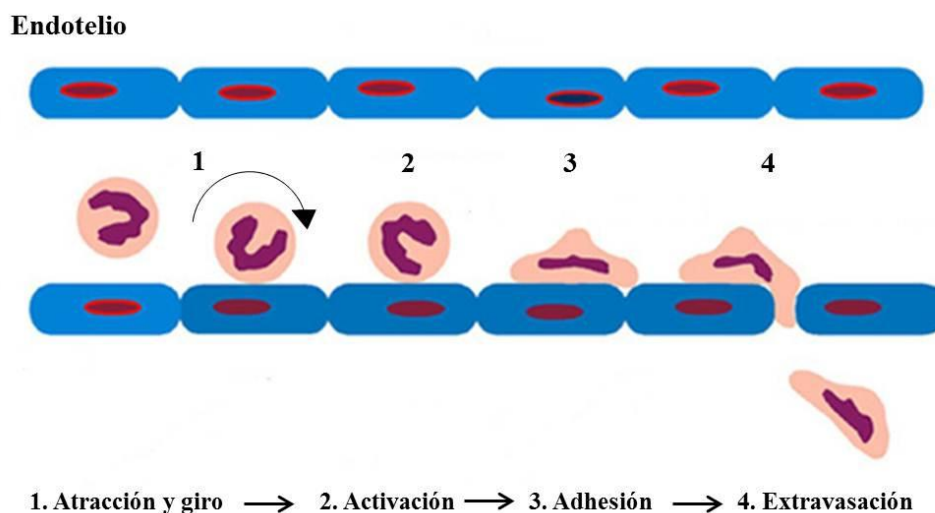


Figura. 7. Modelo de migración linfocitaria. Los cuatro pasos fundamentales son 1) atracción y giro del linfocito por el endotelio, 2) activación de quimiocinas, 3) adhesión a la pared endotelial y por último extravasación o migración transendotelial. Figura modificada de Kitaya et al 2007⁹⁶

- Diferenciación propia a partir de células progenitoras locales

Las células dNK se originan a partir de precursores hematopoyéticos presentes en el endometrio, que se diferenciarían a dNK durante las primeras etapas del embarazo¹⁰³

Un dato que podría apoyar esta teoría es el perfil de expresión de receptores de quimiocinas que presentan las células dNK. Como se ha mencionado anteriormente, las células dNK expresan altos niveles de CXCR3 e intermedios de CXCR4¹¹¹. Sin embargo, no todas las células dNK expresan estos marcadores, aquellas que no los expresan podrían tener un origen local y no migratorio desde la sangre a través del reconocimiento de receptores de quimiocinas¹⁰³.

1.7.3 Células Natural Killer T

Las células natural killer T (NKT-like) comprenden una subpoblación heterogénea de linfocitos T $\alpha\beta^+$ caracterizados por la expresión de marcadores de células T y NK, característicos de las células NKT-like es la expresión de CD1d-L, el cual les permite reconocer antígenos glicolipídicos presentados por la glicoproteína CD1d de tipo MHC I^{112, 113}. La producción por parte de las células NKT-like de citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 puede explicar las capacidades proinflamatorias o tolerogénicas de las células NKT-like, según en qué contexto se encuentren¹¹⁴. Las células NKT-like a su vez, juegan un importante papel en el desarrollo de la respuesta inmunológica, habitualmente se las denominan como “puente” entre la respuesta innata y la adquirida relacionado así los dos brazos del sistema inmunológico¹¹⁵.

La presencia de células NKT-like es constante en la interfase materno-fetal a lo largo del toda la gestación. La activación de células NKT-like puede desencadenar un parto prematuro, así como pérdida gestacional en fase temprana o intermedia. Ito et al. estudiaron la implicación de las células NKT-like en la muerte de las células del trofoblasto¹¹⁶. Las células NKT-like están presentes en un número relativamente bajo en comparación con las uNK en la decidua. Es posible que las células uNK puedan contribuir a la pérdida del embarazo a partir de la activación de las células NKT-like. Estas células NKT-like una vez activadas liberarían IFN- γ al medio y aumentarían la secreción de IL-12, lo que provocaría una activación de las uNK pocas horas después de

la activación de las células NKT-like, las células uNK a su vez liberarían más IFN- γ , aumentando así su actividad citotóxica ¹¹².

1.8 Acción de las hormonas sexuales durante la gestación.

El microambiente hormonal y de citoquinas previo y posterior a la implantación del blastocito es crítico para el establecimiento de los mecanismos de tolerancia inmunológica necesarios para la gestación (Tabla 4).

Los estrógenos estimulan la producción de anticuerpos, alteran la actividad de los linfocitos T periféricos aumentando los linfocitos Treg, reducen el número y la actividad de células NK, aumentan el número y la actividad de granulocitos y macrófagos, reducen la estimulación osteoclástica mediante la disminución de IL-1 y TNF- α , disminuyen la presentación antigénica por parte de las células dendríticas y aumentan las citoquinas de tipo Th2 ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

La progesterona es esencial para el éxito gestacional ³⁷. Esta hormona tiene una función importante en la regulación y secreción de citoquinas por linfocitos T y otras células placentarias. La progesterona regula la implantación del blastocito y el desarrollo de la placenta induciendo un estado de inmunosupresión a través de la secreción de citoquinas tipo Th2 (IL-4 e IL-5) ¹²⁰ por los linfocitos activados que durante el embarazo expresan receptores de progesterona. La unión de la progesterona a su receptor induce la producción de un factor inhibitorio de progesterona (PIBF, progesterone-induced blocking factor). PIBF aumenta la producción de citoquinas Th2 a través del receptor de IL-4 y la activación de la vía JAK/STAT. Además, PIBF inhibe la liberación de perforina por linfocitos de la decidua y reduce el efecto nocivo de la actividad NK en el embarazo. El reclutamiento de células precursoras de las células uNK parece ocurrir en un periodo ventana impulsado por el aumento de estrógenos y LH en plasma y limitado por el aumento de progesterona ^{121, 122}.

Por lo tanto, el aumento de los niveles de los esteroides sexuales durante la gestación, favorece la supresión del rechazo materno-fetal, al inhibir la acción de las células citotóxicas y aumentar la producción de citoquinas anti-inflamatorias, inclinando la balanza hacia una respuesta tolerogénica.

Evento Reproductivo	Actividad Hormonal	Respuesta Innata	Respuesta Adaptativa
Implantación	↑ Estrógeno ↑ Progesterona	Incremento de citoquinas inflamatorias en el endometrio. Proliferación de células NKs uterinas	Disminución de linfocitos T y B en la zona de implantación
Mantenimiento	↑ Estrógeno ↑ Progesterona	Proliferación de células NKs uterinas	Inmunosupresión local tolerancia a la invasión del trofoblasto. Descenso de la repuesta mediada por células. Incremento de T reguladoras.
Nacimiento	↓ Estrógeno ↓ Progesterona	Incremento de la inflamación (Gran afluencia de leucocitos en el útero, aumento de citoquinas pro-inflamatorias)	

Tabla.4. Hormonas y fluctuaciones inmunológicas a lo largo de la gestación. Tabla modificada de Abrams, ET, 2011 ¹²³

1.9 Inmunoterapia

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel que desempeñan las inmunoglobulinas (Ig) en el desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. La respuesta inmunológica está finamente regulada por una compleja red de interacciones moleculares y celulares, en las cuales las Ig actúan no solo como moléculas efectoras de la respuesta inmunológica humoral, sino como mediadores en multitud de funciones de la inmunidad innata y adquirida. Los efectos terapéuticos de las preparaciones de gammaglobulinas intravenosas (GGIV) reflejan en gran parte las funciones de las Ig naturales, si bien se han demostrado efectos inmunomoduladores dependientes de las altas dosis de GGIV empleadas en los procesos autoinmunes, que son menores a los de las dosis sustitutivas empleadas en pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias ¹²⁴.

Las GGIV son el resultado de la purificación de plasma humano procedente de 20.000 a 100.000 donantes sanos, obteniéndose como producto final IgG altamente purificada, que contiene valores traza de IgA e IgM ^{125, 126}. La mejora continua de la calidad de las preparaciones comerciales de GGIV de acuerdo con los criterios de pureza del producto final de la OMS ha redundado en una baja incidencia de efectos adversos. Estos parámetros de seguridad han contribuido, sin duda, al incremento de su utilización clínica, a pesar del todavía limitado número de indicaciones autorizadas por la Agencia Europea del Medicamento (AEM) y la Agencia Española de Medicamentos y Productos

Sanitarios (AEMPS), y de los problemas de abastecimiento debido a la estricta selección de donantes ¹²⁴.

Desde hace más de 3 décadas, la utilización de GGIV ha transformado el horizonte de los pacientes con inmunodeficiencias primarias, reduciendo el número de infecciones y demostrando su eficacia en procesos de etiología autoinmune, como la púrpura trombocitopénica idiopática ^{127, 128}. Desde entonces, las GGIV se han empleado en un amplio espectro de enfermedades autoinmunes e inflamatorias ¹²⁹, enfermedades infecciosas y en la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped en el trasplante de progenitores hematopoyéticos ¹³⁰. En las inmunodeficiencias, las GGIV se administran habitualmente a dosis sustitutivas, de 200-400 mg/kg de peso cada 2-4 semanas, en tanto que en los procesos de base inmunológica, en los que se pretende obtener un efecto inmunomodulador potente, se administran a «altas dosis», habitualmente a 1-2 g/kg de peso con frecuencia mensual ¹²⁴.

1.10 Inmunoterapia con gammaglobulinas en fallo reproductivo recurrente

Durante más de una década, las preparaciones de GGIV han sido usadas en la prevención de abortos espontáneos de causa inmunológica ¹³¹. Durante estos años las GGIV, ya sea en monoterapia o en combinación con otros agentes inmunomoduladores, han sido aplicadas a cientos de mujeres con abortos recurrentes ¹³¹, y este tratamiento ha sido extendido a mujeres con fallo de implantación ¹³². Sin embargo, el mecanismo por el cual la GGIV ejerce su efecto de prevención de aborto no está del todo esclarecido ^{131, 133}.

En el caso de abortos de causa autoinmune, se acepta que la GGIV actúa a través de la red de anticuerpos antiidiotipo, donde los anticuerpos antiidiotipo contenidos en la GGIV son capaces de unirse a los anticuerpos antifosfolípidos formando un complejo idiotipo-antiidiotipo que neutraliza al autoanticuerpo y bloquea su producción. Inicialmente se han propuesto diferentes mecanismos basados en la transferencia pasiva de anticuerpos: a) receptores bloqueantes de anticuerpos, b) moléculas solubles de HLA contenidas en el preparado de GGIV, las cuales inmunizan activamente al sistema inmune materno de tal forma que desarrolla una respuesta protectora para el embrión, c) anticuerpos antiidiotipo frente a anticuerpos anti-HLA. También se ha observado que la GGIV protege al trofoblasto del daño producido por las NK ¹³¹.

En el caso de las mujeres que presentan abortos recurrentes de causa inmunológica se ha observado que la GGIV influye en el equilibrio de células Th1/Th2 en sangre periférica y aumentando la respuesta de tipo Th2. La relación entre TNF- α e infertilidad, y la restauración de la proporción TNF- α /IL-10 después del tratamiento con GGIV apoyan esta hipótesis^{12, 131, 134}. La supresión de la actividad de las células NK por parte de la GGIV ha sido estudiada tanto *in vitro*¹³⁵ como *in vivo*¹³⁶. Los mecanismos por los cuales las GGIV aumentan los porcentajes de recién nacidos vivos incluyen: disminución de la actividad citotóxica de las células NK, aumento de la actividad supresora de las células T, supresión de la producción de autoanticuerpos por parte de las células B, entre otras. La disminución de la actividad citotóxica de las células NK se asocia con el éxito en la gestación¹³⁷.

1.11 Otras terapias inmunomoduladoras

Independientemente del mecanismo de provoca FRR, hoy en día existe una amplia gama de tratamientos disponibles, cuyo objetivo es modular positivamente el sistema inmunológico materno (Figura 8).

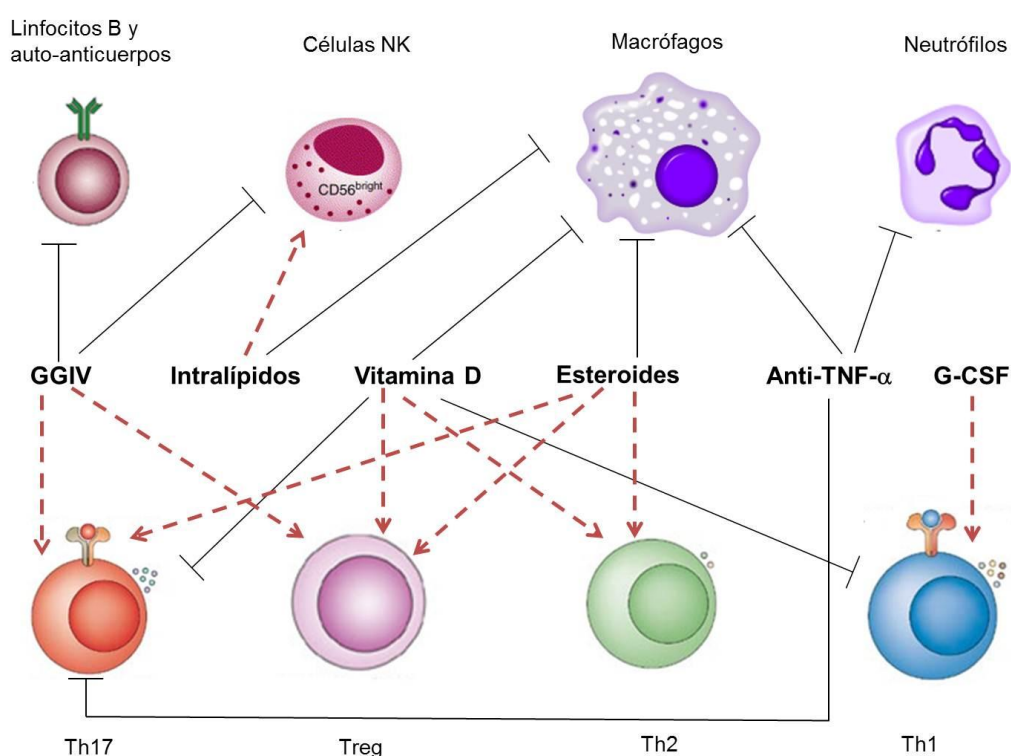


Figura.8. Resumen de los modos de acción de las diferentes terapias inmunomoduladoras usadas en los fallos reproductivos recurrentes. Línea negra: inhibición; Flecha roja: estimulación. En algunos casos el modo de acción es una vía indirecta de otras células y citoquinas. Imagen modificada de Bansal et al, 2012¹³⁴.

1.11.1 Glucocorticoides

Los glucocorticoesteroides tienen la habilidad de reducir la inflamación y suprimir la actividad de diferentes poblaciones celulares del sistema inmunológico, incluidas los linfocitos T. Hay evidencias que sugieren que la terapia con esteroides puede incrementar la función de las células Treg, indicando así la implicación de éstas en enfermedades autoinmunes sistémicas y de alergia severa ¹³⁴. Además, se ha visto que la prednisolona reduce la población de células NK endometriales en mujeres con abortos recurrentes ¹⁰⁰. Curiosamente, la terapia con esteroides ha demostrado un beneficio en mujeres con abortos de repetición ¹³⁸. A lo largo de los años se han realizado diferentes estudios. En 1992, Hasegawa combinó prednisolona con bajas dosis de aspirina en mujeres con AR y síndrome anticuerpos antifosfolípido (SAAF) (n=17), los resultados reflejaban un aumento en la tasa de recién nacido vivo comparado en el grupo de mujeres que no recibieron el tratamiento ¹³⁹. Sin embargo, en estudios donde el tamaño de la muestra es mayor no se encuentran diferencias significativas entre los grupos ¹⁴⁰, pero si se puede considerar la combinación de ambas como una ayuda ¹⁴¹. No obstante, la experiencia con el uso de esteroides como terapia sugiere que la iniciación temprana del tratamiento con esteroides restringido a los primeros meses del embarazo y mujeres sin síndrome SAAF puede ser útil ¹³⁴.

1.11.2 Anticuerpos monoclonales anti-TNF- α .

El TNF- α juega un importante papel en la invasión de trofoblasto y en el suministro de nutrientes para el desarrollo embrionario. Es producido por las células uNK, las células del trofoblasto extravellositario y trofoblasto vellositario. Ya sea sólo o en combinación con IFN- γ , se ha demostrado que TNF- α inhibe la invasión del trofoblasto extravellositario incrementando la apoptosis y disminuyendo la proliferación en el trofoblasto, a la vez que altera la producción de proteasas ¹³⁴. Palmirotta puso de manifiesto en 2010 que las mujeres con fallo reproductivo tenían niveles altos de TNF- α en suero ¹⁴².

Cuando se usa la GGIV en combinación con fármacos inhibidores del TNF- α , como son etanercept (Enbrel[®]) o adalimumab (Humira[®]) se ha observado que ayuda de manera significativa a mejorar la tasa de recién nacido vivo en mujeres con AR ¹⁴³. En 2011 Winger and Reed, comparan entre mujeres con AR y FIR los efectos de adalimumab en combinación con GGIV teniendo en cuenta el ratio de citoquinas TNF- α /IL10

(Th1/Th2). El uso de adalimumab antes de la fecundación en combinación con GGIV, no produce diferencias en la tasa de implantación, tasa de gestación clínica, ni en la tasa de recién nacido vivo, cuando se comparan entre sí mujeres con un desequilibrio medio y severo del ratio de citoquinas ¹⁴⁴.

1.11.3 Intralípidos

Varios estudios sugieren que los intralípidos, emulsiones lipídicas para perfusión intravenosa, podrían modular la función inmunológica, induciendo supresión de la actividad citotóxica de las células NK, así como la generación de citoquinas proinflamatorias ^{145, 146}. Más recientemente, se ha demostrado que los intralípidos suprimen la actividad citotóxica de las células NK con igual eficacia que la GGIV ya sea *in vitro* o *in vivo* ¹³⁷. El mecanismo por el cual los intralípidos suprimen la función de las células NK no se conoce en la actualidad ¹³⁷.

1.11.4 Factor estimulador de colonias de granulocitos

Recientemente, se ha descrito el efecto beneficioso del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) en mujeres (n=68) que habían sufrido abortos de causa no filiada ¹⁴⁷. El mecanismo por el cual G-CSF ejerce un efecto positivo es desconocido, lo que si se conoce es la capacidad de aumentar el crecimiento de células madre. No obstante, la presencia de receptores de G-CSF en el tejido placentario es evidente ¹⁴⁷, registrándose niveles altos de hGC en mujeres receptoras de G-CSF. Se ha demostrado que el G-CSF puede ser beneficioso en mujeres con FIR ¹³⁴. Actualmente, son necesarios más estudios que definan exactamente el papel de G-CSF en AR, así como la dosis, la duración del tratamiento y el beneficio exacto del mismo ¹³⁴. Este tratamiento plantea además cuestiones de seguridad tanto en la madre como en el embrión/feto, por lo que se requieren estudios de seguimiento a más largo plazo.

1.11.5 Vitamina D

La vitamina D es un potente inmunoregulador. En pacientes con enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de vitamina D y la capacidad de las células Treg para suprimir la proliferación de los linfocitos T ¹⁴⁸.

En el caso de la gestación, durante el primer trimestre las células de la decidua producen grandes cantidades de vitamina D comparadas con el tercer trimestre. Además, experimentos *in vitro* señalan que cuando se trata a las células dNK con vitamina D, éstas dejan de sintetizar factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), TNF- α , e IL6¹³⁴. Es posible que en mujeres con AR y déficit de vitamina D, el aporte suplementario de la misma, pueda ayudar a reducir los efectos adversos de las citoquinas inflamatorias y de las células Th17 presentes en la decidua y potenciar a las células Treg¹³⁴. Curiosamente no existen registros sobre el déficit de vitamina D en mujeres con AR, sin embargo desde 2004 se utiliza como tratamiento en base a su capacidad de regular a la baja TNF- α e IFN- γ ¹³⁴.

1.11.6 Terapia hormonal sustitutiva tiroidea

En mujeres con AR, la tiroiditis autoinmune se ha asociado con un aumento del ratio TNF- α /IL10. El uso de terapia hormonal sustitutiva tiroidea, conlleva el éxito gestacional en mujeres con AR y tiroiditis autoinmune¹⁴⁹. El mecanismo de actuación no está del todo esclarecido.

1.12 Mecanismos de acción de la GGIV

Los mecanismos de acción de las GGIV son complejos, debido a que estas poseen una gran actividad inmunomoduladora, que se basa fundamentalmente en la modulación de la expresión de los receptores Fc, según el tipo celular y el estado de receptividad de la célula. Por esta razón, las GGIV pueden ejercer efectos proinflamatorios y antiinflamatorios. En esta memoria vamos a describir los efectos biológicos de las inmunoglobulinas, divididos en aquellos efectos dependientes de la porción Fc, los dependientes de la porción Fab, y los dependientes de ambas, Fc y Fab (Figura9).

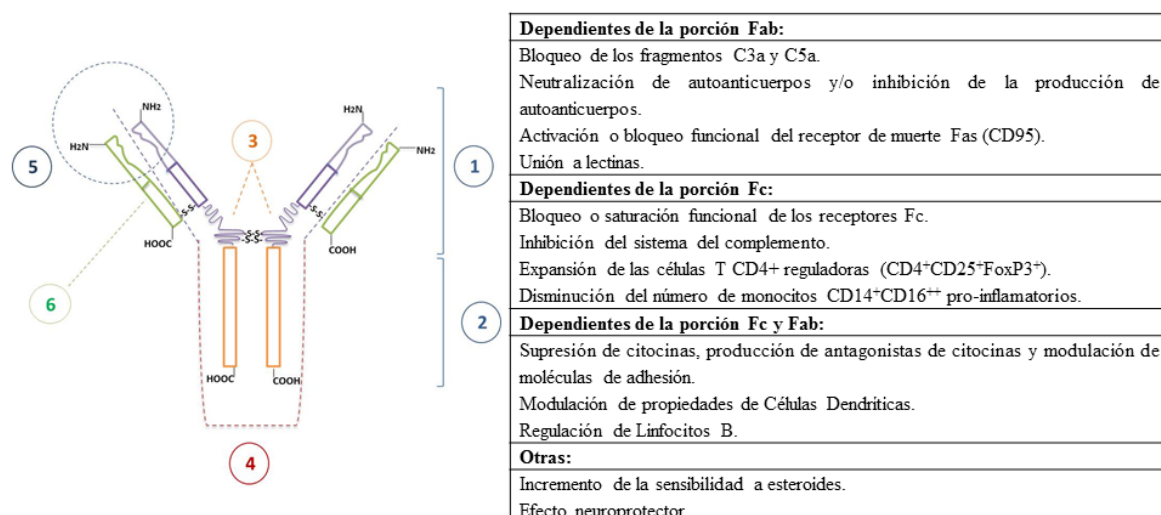


Figura. 9. Estructura esquemática de una molécula de inmunoglobulina G (IgG). 1: región variable Fab. 2: región constante Fc. 3: Bisagra. 4: Cadena pesada. 5: Sitio de unión al antígeno. 6: Cadena ligera. La tabla de la derecha muestra los mecanismos de acción de la inmunoglobulina intravenosa divididos según las regiones de la molécula IgG. S-S: puentes disulfuro. Figura extraída de Ramos-Medina et al, 2012¹²⁴

1.12.1 Estructura de la molécula de inmunoglobulina

Las Ig son glicoproteínas presentes en la membrana de los linfocitos B (constituyendo el receptor del antígeno del linfocito B), o bien en forma secretada soluble (anticuerpos) en los fluidos biológicos (suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, etc.). Todas las Ig poseen una estructura común y simétrica, constituida por 4 cadenas polipeptídicas de 2 tipos distintos: 2 cadenas pesadas (H), que definen la clase y la subclase de la Ig (μ , δ , γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, α 1, α 2, ϵ), unidas por puentes disulfuro, y 2 cadenas ligeras (L), que definen el tipo de la Ig (κ o λ). A su vez, las cadenas H y L comprenden regiones constantes (C) y regiones variables (V) (Figura. 9). Una región bisagra asegura la flexibilidad de la molécula de Ig. Cada Ig se caracteriza por la composición de sus regiones variables y la presencia de glucosilaciones¹²⁴.

Las moléculas de Ig tienen 2 tipos de funciones principales: a) el reconocimiento específico del antígeno (epítipo), a través de la región N-terminal o fragmento Fab; y b) funciones efectoras, llevadas a cabo por la región constante. Se calcula que la GGIV posee anticuerpos con aproximadamente 10 millones de especificidades diferentes. La unión del anticuerpo al antígeno o la agregación de las Ig inducen cambios en la conformación de las regiones constantes y en las señales biológicas, que conducen, entre otras funciones, a la activación del complemento, la unión a las membranas celulares (receptores Fc) y al catabolismo de Ig¹²⁴.

A su vez, las moléculas de Ig pueden comportarse como antígenos y presentan determinantes antigénicos, que se dividen en isotípicos, alotípicos e idiotípicos.

1.12.2 Efectos dependientes de Fc

1.12.2.1 *Bloqueo o saturación funcional de los receptores Fc*

Los receptores Fc contribuyen a la eliminación por parte de los fagocitos de las moléculas o las células que son opsonizadas por la IgG, mediante fagocitosis o citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Este proceso es de gran trascendencia fisiológica, tanto como mecanismo de defensa frente a ciertos agentes infecciosos, como en la fisiopatología de enfermedades mediadas por autoanticuerpos. Este es el caso, por ejemplo, de las citopenias autoinmunes periféricas, como la púrpura trombocitopénica inmune, mediada por autoanticuerpos patogénicos antiplaquetarios. En dichas situaciones, la GGIV satura los receptores Fc en monocitos y macrófagos, bloqueando la fagocitosis de los hematíes opsonizados por anticuerpos y conduciendo a un rápido incremento del número de plaquetas ¹⁵⁰.

1.12.2.2 *Inhibición del sistema del complemento*

La capacidad de unión de la Ig a los fragmentos C3b y C4b del complemento es una función específica de la región Fc de las moléculas de isotipo IgG. Esta función previene el depósito de fragmentos activos de C3 y C4 en los tejidos, lo que conllevaría el bloqueo de la formación de la enzima convertasa C5 (C4b2a3b), previniendo de este modo el daño tisular mediado por el complemento ¹⁵¹⁻¹⁵³. Esta propiedad no se restringe a una subclase de Ig: las 4 subclases de IgG y los diferentes alotipos de IgG presentan una fuerte capacidad de inhibición de C3b/C4b. El depósito de C3b/C4b y la cascada de activación posterior del complemento está implicada, por ejemplo, en la fisiopatología de la dermatomiositis, y por tanto, su inhibición contribuye al beneficio clínico de las GGIV en este trastorno ¹⁵⁴. De hecho, se ha demostrado la disminución de los valores plasmáticos de C5b-9 y de los depósitos de C3b y C5b-9 en los capilares del endomisio en la dermatomiositis ¹⁵⁵.

1.12.2.3 *Expansión de los linfocitos T CD4⁺ reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺)*

Los linfocitos T CD4⁺ desempeñan un papel central en el inicio y mantenimiento de la respuesta inmunológica específica de antígeno. Su activación y posterior diferenciación

es un proceso que requiere varias etapas en la denominada sinapsis inmunológica. Diversos estudios han demostrado la capacidad de GGIV para suprimir la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos y la inhibición de la producción de citoquinas, si bien no se conocen bien los mecanismos que subyacen a este efecto. MacMillan et al. sugieren que tanto la GGIV como los fragmentos de F(ab')₂ podrían inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 ¹⁵⁶. Otro mecanismo por el cual la GGIV puede modular el sistema inmunológico es mediante la expansión en número y potenciación de la función supresora de los linfocitos Treg FOXP3⁺ ¹⁵⁷. De Groot et al. observaron que las moléculas de IgG contienen regiones o epítomos llamados «Treg-itomos» en la región Fc, que son capaces de activar linfocitos Treg CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ ¹⁵⁸. Los linfocitos Treg son células clave en la homeostasis del sistema inmunológico y en la inducción de tolerancia. Se ha demostrado la expansión de las Treg a dosis sustitutivas de GGIV *in vitro*, así como en el modelo experimental de la esclerosis múltiple ¹²⁶. Por tanto, el efecto terapéutico inmunomodulador de la GGIV sobre los Treg podría reflejar un efecto fisiológico. A su vez, las GGIV pueden modular la respuesta inmunológica a través del efecto bidireccional sobre Treg y CD ^{159, 160}. Estudios llevados a cabo por Aubin et al. han demostrado que la GGIV suprime la activación de los linfocitos T CD4⁺ mediante la alteración en la capacidad de las células presentadoras de antígenos (CPA) de presentar antígenos mediante un nuevo mecanismo de internalización de las moléculas IgG presentes en los preparados de GGIV. Este mecanismo supone que la GGIV es sometida a un proceso de proteólisis en el interior de la CPA, en el cual se producen péptidos con la suficiente afinidad como para competir con los péptidos de los antígenos que son expuestos por las moléculas CMH de clase II ^{161, 162}. En el contexto de las enfermedades autoinmunes, esta inhibición tendría como resultado una disminución de la presentación de antígenos propios a los linfocitos T autorreactivos. De este modo, se contribuiría a una reducción de la reestimulación y de la simultánea secreción de autoanticuerpos, contribuyendo a los efectos antiinflamatorios observados en estas patologías.

1.12.2.4 Disminución del número de monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ proinflamatorios

Los monocitos se clasifican en 2 subpoblaciones principales: CD14⁺⁺CD16⁻ (o clásicos) y los CD14⁺CD16⁺⁺ (no-clásicos o proinflamatorios). Los monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ representan aproximadamente el 10% del total de monocitos en sangre y se caracterizan por la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias como TNF- α y la IL-12 ¹⁶³.

Algunas enfermedades inflamatorias, como la enfermedad de Kawasaki, se caracterizan por el incremento del número de monocitos $CD14^+CD16^{++}$ circulantes. La GGIV en la enfermedad de Kawasaki reduce el número de monocitos $CD14^+CD16^{++}$ circulantes por mecanismos aún no bien demostrados, aunque probablemente incluyan mecanismos de apoptosis. Zhao et al. describieron que este tipo de monocitos proinflamatorios presentan una elevada expresión de genes proapoptóticos, haciéndolos susceptibles a este tipo de muerte celular ¹⁶⁴ y convirtiéndolos en la principal diana de la actividad antiinflamatoria de la GGIV. Un posible mecanismo por el que la GGIV induce la apoptosis de los monocitos proinflamatorios es a través de su unión y entrecruzamiento con CD32b ¹⁶³.

1.12.3 Efectos dependientes de Fab

1.12.3.1 *Bloqueo de los fragmentos C3a y C5a*

La capacidad de las Ig para bloquear diferentes componentes del sistema del complemento, como las anafilotoxinas C3a y C5a, a través de su unión con la región Fab ¹⁵⁷, ha favorecido el uso de la GGIV en todas aquellas enfermedades en las que la generación de estos factores desempeña un papel crítico en su patogénesis, como sucede, por ejemplo, en los infartos cerebrales. Estudios realizados sobre un modelo murino de esta patología demuestran que la administración de GGIV 3 horas después de sufrir un proceso de isquemia cerebral reduce significativamente la mortalidad y el tamaño del infarto en un 60% y el déficit neurológico en comparación con los animales control ^{153, 165}.

1.12.3.2 *Neutralización de autoanticuerpos y/o inhibición de la producción de estos*

Modulación a través de los anticuerpos antiidiotipo presentes en la GGIV: aunque los anticuerpos antiidiotípicos son escasos en las preparaciones de GGIV procedentes de un solo donante, las GGIV procedentes de la mezcla de plasma de un gran número de donantes sí los contienen. Estos anticuerpos son capaces de interactuar específicamente con los determinantes idiotípicos de los autoanticuerpos, capacidad que permite a la GGIV regular los clones de linfocitos B autorreactivos *in vivo* ^{166, 167}. La interacción de la GGIV con los autoanticuerpos posee el potencial de neutralizar un autoanticuerpo y de bloquear su producción, uniéndose a los linfocitos B autorreactivos. Dicha actividad

neutralizante o inhibitoria ha sido demostrada, entre otros, para autoanticuerpos dirigidos frente al factor VIII, al ADN, a la tiroglobulina, a los anticuerpos anti-beta-2-glicoproteína I y anticitoplasma de neutrófilo^{168, 169}. Además, la GGIV es capaz de inhibir el desarrollo de aterosclerosis al reconocer anticuerpos dirigidos frente a la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL), un importante factor de aterogénesis¹⁷⁰.

1.12.3.3 *Activación o bloqueo funcional del receptor de muerte Fas (CD95)*

Se ha demostrado recientemente que la GGIV puede inhibir o activar la muerte celular dependiente de caspasas al unirse al receptor Fas (CD95) de la membrana celular^{171, 172}. La GGIV contiene IgG que se unen a diferentes epítomos en la porción extracelular de Fas y son de facto anticuerpos anti-Fas naturales. Se ha demostrado que estos pueden dividirse en IgG anti-Fas agonistas o IgG anti-Fas antagonistas y pueden bien estimular, bien proteger de la muerte celular, por lo que el efecto sobre Fas parece depender en parte del tipo celular sobre el que actúe y ser dependiente de la dosis de Ig¹⁷³.

1.12.3.4 *Unión a lectinas*

Siglec-8. Siglec-8 está altamente expresado en eosinófilos, granulocitos y mastocitos, pudiendo desempeñar un importante papel en las enfermedades alérgicas. La GGIV acelera la muerte espontánea de eosinófilos de manera dependiente de la concentración de GGIV y del tiempo. La eficacia y la potencia de este efecto citotóxico son significativamente incrementadas en presencia de IL-5 y el factor estimulante de colonias granulomonocíticas¹⁷⁴. Experimentos de depleción y bloqueo de eosinófilos han demostrado que los autoanticuerpos anti-Siglec-8 presentes en la GGIV son responsables del incremento de la citotoxicidad sobre eosinófilos. El incremento de la eficacia y potencia de GGIV mediado por Siglec-8 en ambientes ricos en citoquinas podría explicar los efectos antiinflamatorios locales y la aplicación sistemática de GGIV en paciente con hipereosinofilia, indicando un posible mecanismo del efecto beneficioso de la GGIV en enfermedades alérgicas como la enfermedad de Churg-Strauss¹⁷⁵.

Siglec-9. Siglec-9 se expresa fundamentalmente en neutrófilos, granulocitos y monocitos. En cultivos de neutrófilos maduros, la unión de Siglec-9 a anticuerpos monoclonales induce en los mismos apoptosis dependiente de caspasas, de una manera similar a Fas.

Los efectos proapoptóticos de la GGIV sobre neutrófilos están potenciados en presencia de citoquinas proinflamatorias, como el factor estimulante de colonias granulomonocíticas y el interferón IFN γ . La muerte celular mediada por GGIV en presencia de citoquinas implica la liberación de especies reactivas de oxígeno y la activación de vías dependientes e independientes de caspasas^{160, 174-176}.

1.12.4 Efectos dependientes de Fc y Fab

1.12.4.1 Supresión de la producción de citoquinas, inductor de antagonistas de estas y modulación de moléculas de adhesión

Estudios experimentales han demostrado que la GGIV inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1, TNF- α , TNF- β e IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica estimuladas con superantígenos bacterianos o lipopolisacáridos, incrementando en paralelo la producción del antagonista del receptor de la IL-1, molécula antiinflamatoria que contrarresta los efectos de la IL-1¹⁷⁷. Los efectos inmunosupresores de la GGIV en pacientes con enfermedad de Kawasaki y, lo que es más importante, su capacidad para prevenir el desarrollo de aneurismas en las arterias coronarias, podrían estar relacionados con la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a enterotoxinas bacterianas y a citoquinas proinflamatorias. Aunque estos efectos son complejos, parece que los efectos antiinflamatorios implican a ambas porciones (Fc y F(ab')₂) de la IgG, se asocian con una inhibición de la respuesta linfoproliferativa y con una modulación de la producción de citoquinas Th1 y Th2. Análisis por micromatrices han confirmado la regulación a la baja de la IL-22, ICAM-1, la fracción C1q del complemento, TGF- β 1 y la regulación al alta de las quimiocinas CXCL9 y CXCL11 y diversos genes inmunorreguladores tras el tratamiento con GGIV^{178, 179}. De este modo, la GGIV puede ejercer efectos antiinflamatorios en pacientes con enfermedad de Kawasaki, por interrupción o modificación de diferentes pasos en la cascada inflamatoria, desde la inhibición de la función efectora de la célula hasta una reducción de la activación de células del endotelio vascular mediado por citoquinas. Asimismo, la GGIV se une a un gran número de moléculas de membrana de las células del sistema inmunológico que son esenciales en el control de la autorreactividad y de la tolerancia a lo propio¹⁶⁷. Así, se ha demostrado la presencia de anticuerpos frente a las

regiones variables y constantes del receptor humano ab del linfocito T, citoquinas, receptores de citoquinas, CD5, CD4, moléculas HLA de clase I, CCR5 y Fas.

1.12.4.2 *Modulación de las propiedades de las células dendríticas*

Los fragmentos Fc y F(ab')₂ de la GGIV son capaces de mediar la supresión de CD, sugiriendo que la señalización de eventos mediados por ambos FcγR y no-FcγR podría estar implicada en la modulación de la función de CD mediada por GGIV. Esta modula la secreción de citoquinas esenciales para la maduración de la CD y para la respuesta mediada por linfocitos T *in vitro* tras la incubación de CD con GGIV la expresión del CMH clase II es menor; este resultado afecta directamente la capacidad de la CD madura de producir IL-12¹⁷³. No ocurre lo mismo con la secreción de IL-10, que se ve aumentada. Este fenómeno tiene como consecuencia la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T autorreactivos y alorreactivos. En relación con los efectos de la GGIV sobre la interacción de CD y células NK, se ha demostrado que tras la incubación *in vitro* de monocitos derivados de CD con GGIV, la expresión de CD1d y la activación de CD1d restringida a células NKT-like aumenta, sugiriendo que las CD podrían activar a las células inmunorreguladoras NKT-like¹⁸⁰⁻¹⁸². Estos resultados sugieren indirectamente un papel de los linfocitos B (como fuente de anticuerpos, citoquinas y quimiocinas) en la regulación de la función de las CD41. Existen evidencias de que las CD, como las NK-CD o CD productoras de IFN, pueden inducir la apoptosis o lisis de las células diana, como linfocitos T o células tumorales. Esto implicaría una nueva vía por la cual la GGIV induce citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos^{183, 184}.

1.12.4.3 *Regulación de los linfocitos B*

En los últimos años distintos estudios han demostrado que la GGIV inhibe el receptor de linfocito B, que es a su vez una Ig de membrana, por un mecanismo dependiente o independiente de la presentación de antígeno. Este efecto inhibitorio no está mediado por el receptor FcγRIIβ, sino por mecanismos intracelulares no aclarados mediante los cuales la GGIV es internalizada en el interior del linfocito B, inhibiendo como consecuencia la presentación del antígeno¹⁸⁵. Por otra parte, estudios realizados por De Grandmont et al. indican que, bajo condiciones específicas de activación de linfocitos B a través de CD40, la GGIV puede promover la diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de IgG, aumentando la secreción de inmunoglobulinas¹⁸⁶. A su vez,

experimentos llevados a cabo por el grupo de Basta sugieren que la adición de GGIV a cultivos de linfocitos B disminuye la expansión de células B entre un 50 y un 80% ¹⁸⁷. Como sucede con otras actividades inmunomoduladoras de la GGIV, los diferentes efectos descritos en sistemas *in vitro* podrían depender del modelo usado y del estado de activación de las células.

2. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es conocer, con datos objetivos procedentes de un estudio retrospectivo observacional, en una muestra con un número significativo de casos, el efecto del tratamiento con gammaglobulina intravenosa en un grupo de mujeres con fallo reproductivo recurrente. Dichas pacientes fueron evaluadas y tratadas en su mayoría en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” y en la Clínica Tambre de Madrid.

Objetivo Principal del Estudio.

- I. Evaluar y comparar el efecto clínico del tratamiento con GGIV durante la gestación en pacientes con FRR que asocian expansión de células NK/NKT-like sobre tasa de gestación y de recién nacidos vivos.

Objetivos Secundarios del Estudio.

- I. Estudiar las subpoblaciones linfocitarias de células NK y NKT-like, en el grupo de estudio y en el grupo control.
- II. Identificar los factores de riesgo y los biomarcadores predictivos asociados a fallo reproductivo recurrente.
- III. Diseñar un modelo de decisión que permita definir el riesgo de aborto en las pacientes.

3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional retrospectivo multicéntrico de cohortes para evaluar y comparar el efecto del tratamiento con gammaglobulinas intravenosas sobre la seguridad, la tasa de gestación y la tasa de recién nacidos vivos en mujeres con fallo reproductivo recurrente y expansión de células NK/NKT-like en sangre periférica en nuestro ámbito y condiciones de uso real.

El trabajo se dividió en cuatro apartados respondiendo a los objetivos marcados, dando lugar a cuatro apartados dentro del capítulo de “Resultados” con diferentes grupos de pacientes y controles, que se resumen a continuación:

- I. Estudio de las poblaciones linfocitarias de células NK y NKT-like (inmunofenotipaje de las subpoblaciones de células NK: $CD3^-CD56^{bright}CD16^-$, $CD3^-CD56^{dim}CD16^+$, $CD3^-CD56^-CD16^+$ y $CD3^+CD56^+$ en fase menstrual y fase periovulatoria del ciclo menstrual) en SP en el grupo control de mujeres sanas. Este punto es esencial para determinar puntos de corte de cada subpoblación linfocitaria en nuestra población de pacientes y rangos de referencia normales.
- II. Estudio comparativo de las poblaciones linfocitarias de células NK y NKT-like entre las mujeres del grupo de estudio y el grupo control. Identificación de factores de riesgo.
- III. Diseño de un modelo de decisión multivariante basado en las principales variables de riesgo (edad materna, %NK y % $CD3^-CD56^{dim}CD16^+$)
- IV. Evaluación del efecto clínico del tratamiento con gammaglobulina intravenosa en pacientes con fallo reproductivo recurrente que asocian expansión de células NK/NKT-like sobre la tasa de gestación y la tasa de recién nacidos vivos.

3.2 Sujetos del estudio.

3.2.1 Estudio observacional retrospectivo en mujeres con fallo reproductivo recurrente tras tratamiento con gammaglobulina intravenosa.

Se seleccionaran de todas las pacientes evaluadas, aquellas que reúnan criterios tanto de AR como de FIR y que presenten expansión de células NK y/NKT-like, desde 2005 a octubre de 2011. Según exposición al tratamiento con GGIV, las pacientes se dividirán en dos cohortes retrospectivas:

Cohorte de estudio: pacientes con abortos recurrentes y pacientes que presentan fallo de implantación recurrente tras fecundación *in vitro* (FIV) y expansión en sangre periférica de células NK y/o NKT-like que hayan recibido gammaglobulinas intravenosas durante la gestación.

Cohorte control: Los criterios de selección para este grupo fueron mujeres con ciclo menstrual regular y fertilidad demostrada, no utilizar anticonceptivos hormonales ni esteroides y hemograma normal. Todas las mujeres incluidas fueron informadas y firmaron un consentimiento informado. Cada mujer fue estudiada en su fase menstrual y en su fase periovulatoria del ciclo, para determinar el punto de corte de las células NK y NKT-like, que debe considerarse asociado con mayor sensibilidad y especificidad para FRR en nuestra población.

Los diferentes grupos estudiados se describen a continuación:

Grupo de abortos recurrentes: grupo de estudio. Pacientes con al menos 3 abortos espontáneos antes de la semana 20 de gestación de causa no filiada (n=217).

Grupo de fallo de implantación recurrente: grupo de estudio. Pacientes con al menos 3 fallos previos tras un ciclo de FIV con transferencia de dos embriones de buena calidad (n=211).

Grupo con fertilidad demostrada: grupo control. Pacientes con fertilidad demostrada y ciclos menstruales regulares (n=50).

3.3 Protocolo clínico. Variables estudiadas.

Los datos de cada paciente se recogieron en un protocolo de trabajo, en el que se ordenaron todas las variables del estudio por grupos.

Se recogerá la información correspondiente a todas las pacientes incluidas en las cohortes del estudio. Las variables a analizar se distribuirán en diferentes grupos.

3.3.1 Variables epidemiológicas

Forman parte de este grupo la edad de las pacientes, los estudios de las causas de infertilidad, número de ciclos previos de terapia reproductiva, tratamientos previos empleados, ovodonación, complicaciones médicas.

3.3.2 Variables clínicas

Tasa de gestación: porcentaje de gestación clínica positiva en ambos grupos, considerando cada paciente y en relación con el número de transferencias realizadas. En este caso hemos seguido el criterio de la SEF que considera gestación positiva sólo si se evidencia ecográficamente un saco embrionario.

Tasa de recién nacido vivo: porcentaje de recién nacidos vivos en cada grupo.

3.3.3 Variables inmunológicas

Niveles séricos de inmunoglobulina G (IgG); porcentaje de subpoblaciones de linfocitos NK periféricos. Análisis comparativo de la evolución de marcadores inmunológicos (porcentaje de la población de células NK/NKT-like). Estudios de poblaciones linfocitarias incluidas en el estudio inmunológico. Estudio de citoquinas Th1, Th2, Th17 dentro del estudio inmunológico de seguimiento de la Unidad de Inmunología Clínica. Estudio de HLA y KIR en las parejas en las que se haya realizado como parte del estudio de rutina realizado en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

3.3.4 Variables de seguridad

Todas las reacciones adversas medicamentosas (RAM) que se hayan producido a lo largo del tiempo que duró el tratamiento han sido registradas. Incluyendo monitorización de tolerancia a corto plazo (reacción local, tensión arterial, frecuencia cardiaca, temperatura, frecuencia respiratoria). La reactogenicidad se ha evaluado mediante el registro de síntomas y signos del paciente a través de entrevistas a los pacientes durante sus revisiones. Los eventos adversos locales previstos leves son dolor, eritema e induración en el lugar de la inyección. Los generales incluyen la fiebre,

cefalea y el malestar general. Efectos moderados son aquellos suficientes para restringir la actividad habitual, aunque no la impiden. Se han recogido los eventos adversos no esperados, así como los eventos graves, los cuales se definen como cualquier evento médico desfavorable que amenace la vida, ocasione alguna discapacidad, requiera de hospitalización, o produzca la muerte.

3.4 Técnicas de laboratorio.

3.4.1 Extracción y procesamiento de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre periférica de los pacientes y los controles se tomaron entre las 9:00 h y las 10:00 h de la mañana, mediante punción venosa, se recogieron en tubos de EDTA estériles y en tubos seco para suero, y se procesaron en las 2 horas de la recolección. Las muestras se incubaron con correspondientes anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los eritrocitos se lisaron con solución lisante FACs (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania) y las muestras se lavaron con solución fosfato-salina (Phosphate buffered saline, PBS) posteriormente. Las células NK y sus subpoblaciones se analizaron mediante citometría de flujo de 4 colores según procedimiento descrito en la sección 3.4.2 de este apartado. Se emplearon controles isotípicos para determinar los niveles de fluorescencia de fondo. La adquisición y el análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (4 colores) (Becton-Dickinson, San José, California) empleando el software Cell-Quest.

3.4.2 Inmunofenotipaje de las subpoblaciones de las células natural killer de sangre periférica.

Las células se marcaron por marcaje directo con los siguientes anticuerpos conjugados: CD69 Isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD16 fitoeritrina (PE), CD3 proteína peridín-clorofila (PerCP), CD56 alofococianina (APC). Las muestras se adquirieron inmediatamente después de finalizar el marcaje. Se adquirieron 20.000 eventos dentro de una región de linfocitos definida por las características de tamaño (Forward-scatter, SSC) y complejidad (Side-scatter, FCS) (Región 1, R1). Se establecieron diferentes estrategias de selección para definir las diferentes subpoblaciones de NK circulantes:

Creando un región (R2) negativa para CD3 dentro de R1 y analizando CD56 frente a CD16, las células eran CD56^{bright} CD16⁻ se consideraron NK reguladoras y las CD56^{dim}

CD16⁺ se consideraron NK citotóxicas⁸⁵. A partir de la región R1 y enfrentando CD3 a CD56, las células que eran CD3⁺ CD56⁺ se consideraron NKT-like. Los porcentajes de cada subpoblación celular se expresaron respecto al total de linfocitos (R1). (Figura.10)

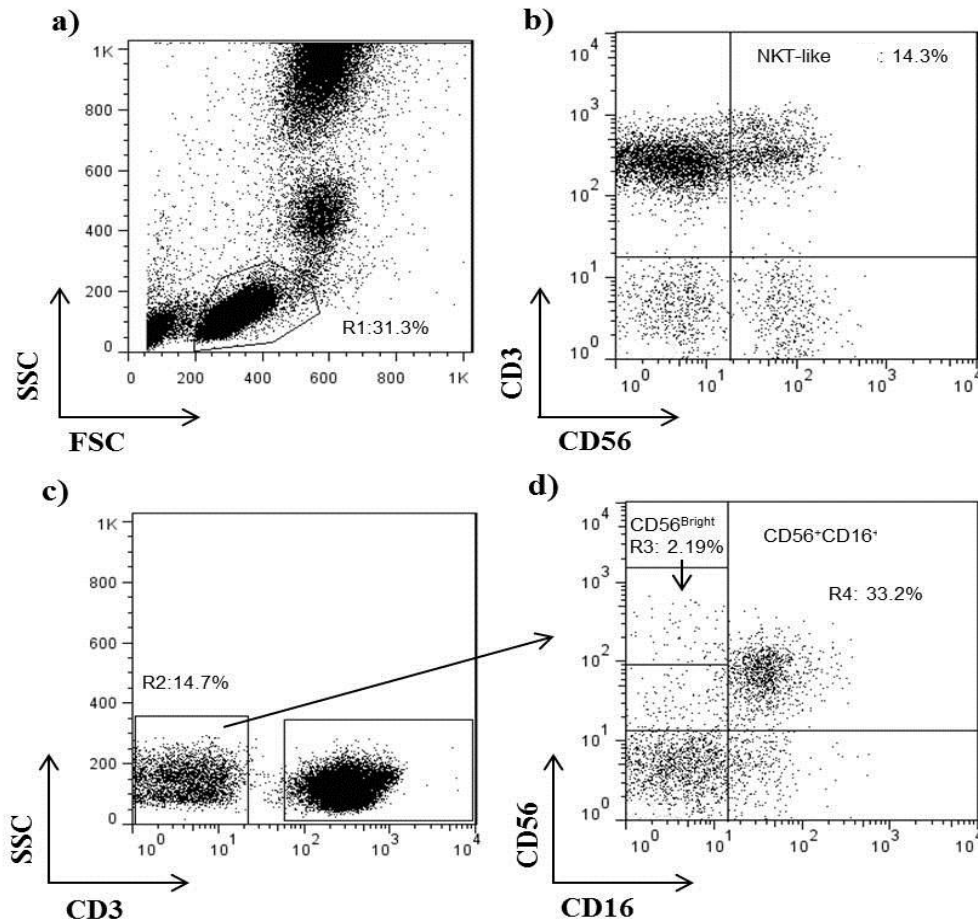


Figura.10. Estrategia de análisis para las subpoblaciones de las células NK. a) Total de eventos de sangre periférica se representaron como tamaño (FSC) frente a complejidad (SSC). b) Las células NKT-like se analizan seleccionando el total de linfocitos (R1) y enfrentando CD56 a CD3. Las dobles positivas (CD3⁺CD56⁺) corresponderían a las células NKT-like. c) La región R1 la representamos CD3 frente a SSC y seleccionamos la nube de células que se encuentran en la zona de negativa para CD3 (R2). d) Las células de la región R2 las representamos en un gráfico CD16 frente CD56. Las negativas para CD16 y con una expresión alta de CD56 corresponden a la subpoblación CD56^{Bright} (R3). Las células doble positivas para ambos marcadores representan la subpoblación de CD56^{dim}CD16⁺ (R4).

3.4.3 Protocolo para el tratamiento con Inmunoglobulina intravenosa

El protocolo terapéutico de la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital Gregorio Marañón es el siguiente:

Dosis de inducción: 400 mg/kg de peso en semana 0, 2, 4, 7, 10 y 13 en casos de FIV y en semanas 4, 7, 10 y 13 en abortos de repetición.

Dosis de mantenimiento: 200 mg/kg de peso cada 3 semanas hasta semana 35 (gestación a término).

3.5 Técnicas estadísticas

3.5.1 Procesamiento de los datos

Los valores de las subpoblaciones de linfocitos NK, NKT-like y las subpoblaciones se expresaron en porcentaje, con respecto a los linfocitos totales y células NK, respectivamente

3.5.2 Distribución de las variables

3.5.2.1 Test de Kolmogorov-Smirnov

Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas en este estudio se usó el test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Esta prueba compara la función de distribución acumulada observada para una variable, con una distribución teórica normal. La Z de Kolmogorov-Smirnov se calcula a partir de la diferencia mayor (en valor absoluto) entre las funciones de distribución acumulada teórica y observada^{188, 189}.

3.5.3 Tablas de contingencia

3.5.3.1 Prueba chi-Cuadrado de Pearson

Mide la asociación entre dos variables cualitativas o categóricas. Se contrasta si ambas variables son o no independientes¹⁹⁰.

3.5.4 Pruebas paramétricas

3.5.4.1 Prueba t-Student

La prueba t-Student se utiliza para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal. También proporciona resultados aproximados para los contrastes de medias en muestras suficientemente grandes cuando estas poblaciones no se distribuyen normalmente (aunque en este último caso es preferible realizar una prueba no paramétrica).

3.5.4.2 Coeficiente de correlación lineal de Pearson (r)

Este coeficiente permite estudiar la fuerza de asociación lineal entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación lineal inexistente) si $r=0$, aumentando a medida que el valor de r se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente r indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo¹⁸⁸.

3.5.4.3 Análisis de la varianza

La comparación de las medias de cada variable en los distintos grupos estudiados se efectuó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Este análisis estudia la variabilidad entre los grupos y dentro de los grupos. La F Snedecor detectará si las medias de al menos un grupo difiere del resto¹⁹⁰.

El análisis de la varianza exige el cumplimiento de una serie de condiciones para poder ser aplicada: La variable ha de seguir una distribución normal en los grupos estudiados y las varianzas han de ser homogéneas entre los grupos. La normalidad de cada una de las variables se comprobó previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; la homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante la prueba de Levene.

3.5.4.4 Análisis de la varianza para medidas repetidas

Este análisis es una variante de la ANOVA que analiza grupos de variables dependientes relacionadas, de las que se tienen distintas mediciones del mismo individuo. Tiene las mismas restricciones que la ANOVA.

3.5.4.5 Regresión lineal múltiple

El análisis de regresión es una técnica estadística de análisis multivariante que estudia las variaciones de una variable cuantitativa continua en función de una o varias

variables cuantitativas continuas o dicotómicas. La variable cuya variabilidad se quiere estudiar es la variable dependiente y las variables en función de las cuales varía son las variables independientes ¹⁹¹.

Este tipo de análisis exige que todas las variables incluidas sigan una distribución normal, y que la asociación entre cada una de las variables independientes y la variable dependiente sea de tipo lineal (ya que la ecuación de regresión que proporciona este análisis es de tipo lineal). Esto se comprobó previamente mediante análisis bivariante aplicando el análisis de correlación lineal de Pearson.

Se comprobó la ausencia de multicolinealidad entre las variables independientes. La multicolinealidad consiste en la existencia de un alto grado de correlación entre las distintas variables independientes incluidas en la ecuación de regresión. Aunque la existencia de multicolinealidad no imposibilita la obtención de una ecuación de regresión, sí puede alterar la utilidad e interpretación de la misma.

3.5.4.6 Regresión Logística

El modelo de regresión logística permite relacionar factores cuantitativos y categóricos con respuestas binarias. La variable dependiente (Y) es una variable dicotómica (positivo/negativo) y las variables independientes (Xi), una o varias, pueden ser cuantitativas y/o dicotómicas con valores 0 y 1. Los parámetros del modelo se estiman por el método de máxima verosimilitud. Para cada variable independiente X se indica el Odds Ratios (OR), que es el factor por el que se multiplica el cociente entre la probabilidad de una respuesta positiva de Y y la probabilidad de una respuesta negativa de Y (odds) cuando la variable X se incrementa en una unidad ¹⁹².

Un valor de OR superior a 1, llamémosle n , y estadísticamente significativo ($p < 0,05$) indica que la probabilidad de que aparezca la respuesta Y es n veces superior entre los que presentan el factor X que entre los que no lo presentan. Cuando el valor de OR es inferior a 1 y estadísticamente significativo ($p < 0,05$), la interpretación es la contraria a la anterior, la probabilidad es $1/n$ veces inferior.

3.5.5 Pruebas no paramétricas

Las pruebas estadísticas no paramétricas se usaron cuando la muestra fue pequeña o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas) ^{188, 189}.

3.5.5.1 “H” de Kruskal-Wallis

Análogo no paramétrico del análisis de varianza de un factor. Contrasta si varias muestras independientes proceden de la misma población. Esta prueba estadística compara diferencias a nivel global entre los distintos grupos estudiados. Cuando las diferencias fueron significativas, se utilizó la prueba “U” de Mann-Whitney para comprobar cuáles eran los grupos que diferían significativamente.

3.5.5.2 “U” de Mann-Whitney

Contrasta si dos muestras de dos subpoblaciones tienen la misma distribución. Las observaciones de ambos grupos se combinan y clasifican con respecto al rango promedio asignado en caso de producirse empates. Si la posición de las poblaciones es idéntica, deberán mezclarse aleatoriamente los rangos en ambas muestras.

3.5.5.3 Prueba de Wilcoxon

Para el contraste no paramétrico de dos muestras relacionadas se utiliza la prueba de Wilcoxon. Al igual que la prueba “U” de Mann-Whitney, la prueba de Wilcoxon se presenta como alternativa a la t de Student cuando el supuesto de normalidad no es asumible.

3.5.5.4 Análisis de correlación de Spearman (R)

Variante de coeficiente de correlación de Pearson. Es una medida de asociación que se calcula a partir de la asignación de rangos a los valores ordenados. Dicha asociación será nula si $R=0$, aumentando a medida que el valor de R se aproxima a 1 ó a -1. El signo del coeficiente R indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inverso cuando es negativo.

3.5.6 Modelo de decisión multivariante.

Hemos desarrollado un modelo de decisión multivariante jerárquico basado en un árbol binario de clasificación y regresión que intenta maximizar la homogeneidad dentro del nodo, medida por el índice de Gini. Este método nos permitió tener en cuenta también las observaciones con valores para algunas de las variables predictivas, utilizando las reglas de clasificación de “subrogate”. Asumimos una prevalencia base de aborto de 10% de la población¹⁹³.

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas y epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.

Para realizar el estudio se evaluaron un total de 428 mujeres con fallo reproductivo recurrente, siendo 217 diagnosticadas de aborto recurrente (AR) y 211 de fallo de implantación recurrente (FIR), según los criterios diagnósticos previamente expuestos. El grupo control consistió en cincuenta mujeres sanas de fertilidad demostrada y con ciclos menstruales regulares, a las cuales se les evaluó en la fase menstrual y en la fase periovulatoria del ciclo menstrual.

Las mujeres pertenecientes al grupo AR tenían una edad media de $36,48 \pm 3,63$ años, siendo la edad mínima de 27 años y la máxima de 43 años. Para el caso de las mujeres incluidas en el grupo de FIR, su media de edad fue de $37,55 \pm 3,36$ años, con un rango entre 29 y 46 años. El grupo control presentó una media de edad de $30,75 \pm 6,65$ años y un rango entre 23 y 45 años. Respecto al número de abortos previos sufridos, el grupo de AR presentó una media superior de abortos ($3,39 \pm 1,37$) abortos comparados con el grupo de FIR ($0,20 \pm 0,60$ abortos). En el grupo de AR, la mayoría de los abortos ocurrieron en torno a la semana $7,85 \pm 3,28$ de gestación, mientras que en el grupo de FIR en su mayoría los abortos sucedieron alrededor de la semana $8,45 \pm 5,20$ de gestación. En el caso del grupo control ninguna de las mujeres incluidas registró a lo largo de su historia reproductiva ningún episodio de aborto. El número de ciclos de fecundación *in vitro* previos a los que se sometieron las mujeres del grupo con FIR fue de $4,72 \pm 2,36$ ciclos (rango, de 3 a 16 ciclos de FIV). Al igual que ocurriera con el número de abortos, en el grupo control, ninguna de las mujeres se sometió a ciclos de FIV. La media de embriones transferidos en los ciclos de FIV fue de $2,01 \pm 0,53$ embriones. En el caso de muerte fetal, sólo se registraron 4 casos (1,84%) en el grupo de pacientes con abortos recurrentes, con una media de $34,63 \pm 2,20$ semanas (Tabla 5).

Características	Grupo de Estudio		Grupo Control
	AR (n=217)	FIR (n=211)	(n=50)
Edad Materna (años) (Rango)	36,48±3,63 (27-43)	37,55±3,36 (29-46)	30,75±6,65 (23-45)
Nº de Abortos (Rango)	3,39±1,37 (3-11)	0,20±0,60 (0-3)	-
Nº de FIV (Rango)	-	4,72±2,36 (3-16)	-
Aborto (semana) (Rango)	7,85±3,28 (2-26)	8,45±5,20 (2-23)	-
Nº de embriones transferidos (Rango)	-	2,01±0,53 (1-6)	-
Nº de Muertes Fetales (%)	4 (1,84%)	-	-
Muerte Fetal (semana) (Rango)	34,63±2,20 (33-39)	-	-

Tabla.5. Características epidemiológicas de los grupos de estudio (AR y FIR) y del grupo control. . Los valores están expresados como media±desviación estándar y rango.

4.2 Distribución de las pacientes incluidas en el estudio

Una vez descritas las características clínicas y epidemiológicas de las pacientes, se llevó a cabo la distribución de las mismas en función de la presencia de posibles factores de riesgo asociados con fallo reproductivo.

Se estudió cuántas mujeres incluidas en nuestra población presentaban únicamente expansión de células NK como única alteración inmunológica. 175/428 mujeres (41%) de la población de estudio fueron diagnosticada únicamente con expansión de células NK.

4.2.1 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, causa inmunológica y trombofilia.

En todas las mujeres incluidas en el grupo de FRR se les estudió las mutaciones en tres de los genes más representativos de trombofilia como parte del estudio de rutina de FRR, como son MTHFR, Factor V y Factor II y se analizó la distribución de las pacientes teniendo en cuenta la presencia o ausencia de expansión de las células NK/NKT-like. En este apartado sólo consideramos estas variables. De las 428 mujeres totales, 106 (25%) presentaron sólo mutaciones en alguno de los tres genes estudiados.

En 122 de los casos (28%) manifestaron expansión de células NK y/o NKT-like. En 116 mujeres (27%) se clasificaron con mutación para alguno de los tres genes relacionados con trombofilia y a su vez presentaron expansión de células NK/NKT-like. Sólo en 42 (10%) de los casos revisados no se detectó mutación ni expansión en ninguna de las dos poblaciones linfocitarias estudiadas. Se quedaron fuera de este análisis 42 (10%) casos ya que faltaba algún dato relacionado con las variables de estudio (Figura 11).

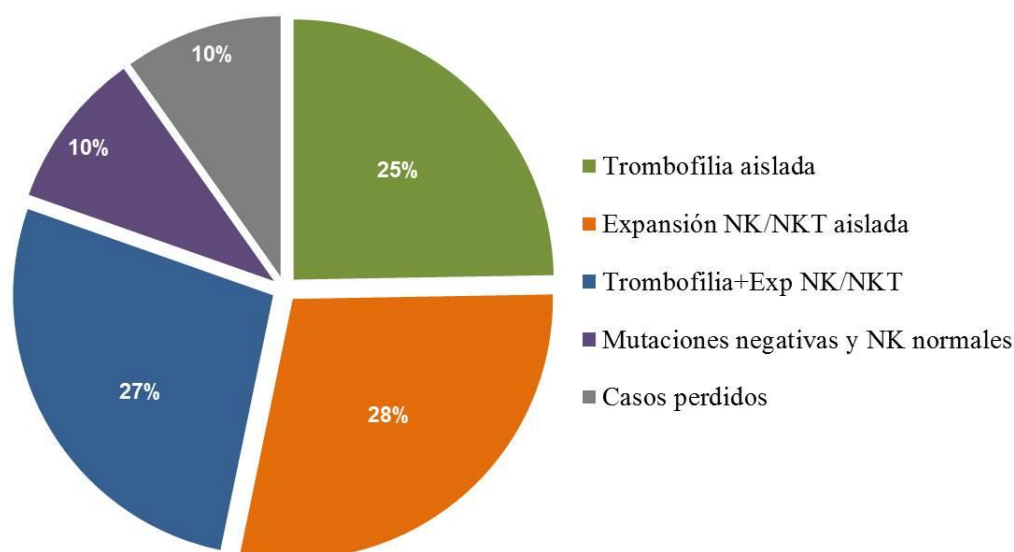


Figura. 11. Distribución de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR), en función de la presencia o ausencia de trombofilia y/o expansión de células NK/NKT-like.

Cuando se estudió de manera más detallada mediante la herramienta estadística de la “chi-cuadrado”, se demostró que no existe relación entre la expansión de células NK y la presencia de trombofilia congénita.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes 178 pacientes de un total de 319 presentaron mutación de tipo heterocigoto para MTHFR (55.79%), Cuando se analizó la mutación de tipo homocigoto para MTHFR, se halló que 33/319 (10,34%) mujeres del grupo FRR la presentaban (Tabla 6).

En el caso del Factor V sólo en 12/311(3,85%) mujeres con FRR se encontró mutación heterocigota.

De forma similar a la mutación del Factor V, sólo 10/310 mujeres clasificadas con FRR, presentaron mutación para el Factor II (Tabla 6).

Se evaluó la presencia de manera simultánea de varias de estas mutaciones y lo que se obtuvo fue que 3/428 de las pacientes con FRR presentaron mutación en MTHFR y Factor V, lo que supone un 0,70% del total de la población. A su vez, sólo una paciente manifestaba mutación en MTHFR y Factor II, representando un porcentaje 0,2%, de prevalencia en la población de estudio. En dos mujeres se puso de manifiesto que presentaban mutación en el Factor V y Factor II lo que representan un 0,5% de la población total. Solamente un caso (0,2%) de las mujeres incluidas en el grupo FRR presentó mutaciones en los tres genes.

Cuando se evaluó distinguiendo entre los grupos con AR y FIR, se observó que los casos positivos para las mutaciones MTHFR/Factor V/Factor II y MTHFR/Factor II corresponden al grupo de mujeres diagnosticadas con AR. Los casos positivos para las mutaciones Factor V/Factor II pertenecen a los grupos AR (n=1) y FIR (n=1). En el caso de las mutaciones presentes en MTHFR/Factor V se distribuyen de la siguiente forma 1 en el grupo con AR y 2 en el grupo con FIR.

Enfermedad Asociada		Categoría Clínica		
Trombofilia	Aborto Recurrente	Fallo de Implantación Recurrente	Fallo Reproductivo Recurrente	
MTHFR sin mutación	60 38,46%	48 29,44%	108 33,85%	
MTHFR mut. heterocigota	80 51,28%	98 60,12%	178 55,79%	
MTHFR mut. homocigota	16 10,25%	17 10,42%	33 10,34%	
Total(n, %)	156 (48,90%)	163 (51,09)	319	
Factor V sin mutación	150 96,77%	149 95,51%	299 96,14%	
Factor V mut. heterocigota	5 3,22%	7 4,48%	12 3,85%	
Total(n, %)	155 (49,83%)	156 (50,16%)	311	
Factor II sin mutación	148 94,26%	152 99,34%	300 96,77%	
Factor II mut. heterocigota	9 5,73%	1 0,65%	10 3,22%	
Total(n, %)	157 (50,64%)	153 (49,35%)	310	

Tabla.6. Distribución de pacientes según categoría clínica y trombofilia asociada

4.2.2 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, inmunológica y enfermedad autoinmune.

A todas las mujeres pertenecientes al grupo con fallo gestacional recurrente, se les realizó un estudio inmunológico completo para descartar posibles enfermedades autoinmunes subyacentes asociadas al FRR. Principalmente, se estudiaron los anticuerpos relacionados con el síndrome antifosfolípidos, enfermedad celiaca (Tabla 7 y 8).

4.2.2.1 Síndrome antifosfolípido

Se analizaron los anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β 2-glicoproteína I de isotipo IgG e IgM, en todas las pacientes pertenecientes al grupo de FRR. Los resultados que se obtuvieron ponen de manifiesto que en un total de 36 pacientes (9,30%) que fueron positivas para los anticuerpos anti-cardiolipina. Si se distingue entre grupos, dentro de las mujeres con AR el 8,63% (n=17) fueron positivas para anticuerpos anti-cardiolipina. En el caso de las mujeres con FIR sólo el 10% (n=19) presentaron anticuerpos anti-cardiolipina (Tabla7).

El 4,78% (n=18) de un total de 376 mujeres con FRR fueron positivas para anti- β 2-glicoproteína I. En el caso de las mujeres diagnosticadas con AR 3,68% (n=7) fueron positivas para anti- β 2-glicoproteína I. El 5,92% (n=11) del grupo clasificado como FIR presentaron anticuerpos anti- β 2-glicoproteína I (Tabla 7).

A continuación se estudió quienes de todas ellas presentaban positividad para ambos anticuerpos. En este caso, en nuestra población de estudio sólo en 9 mujeres (AR n=3 y FIR n=6) se detectó la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β 2-glicoproteína simultáneamente lo que representa un 2,10% del total de la muestra.

Posteriormente se analizó cuantas de ellas presentaban anticuerpos positivos junto con expansión de células NK y/o NKT-like. Lo que se obtuvo fue que 6,30% (n=7) de las pacientes incluidas en el grupo con AR presentaron anticuerpos positivos anti-cardiolipina y expansión de células NK (>12%). En el caso del grupo con FIR el 10% (n=9) fueron diagnosticadas con expansión de células NK y anticuerpos anti-cardiolipina. En el caso de la presencia de anticuerpos anti- β 2-glicoproteína I junto con expansión de células NK en el grupo de AR se registraron 5 casos positivos (4,50%), en

el caso de las pacientes incluidas diagnosticadas con FIR 4 casos (4,44%) presentaron ambas condiciones (Tabla 8).

Cuando se estudió la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina o anti- β 2-glicoproteína I en combinación con expansión de células NKT-like ($>10\%$), se observó que en el caso del grupo con AR ninguna de las pacientes incluidas presentó expansión de células NKT-like y anticuerpos anti-cardiolipina o anti- β 2-glicoproteína I de manera conjunta. Sin embargo en el grupo con FIR se detectó dos casos positivos, 1 (5,26%) para el caso de valores altos de células NKT-like y anticuerpos anti-cardiolipina positivos, y 1 (5,26%) para expansión de células NKT-like y anticuerpos anti- β 2-glicoproteína I (Tabla 8).

4.2.2.2 *Enfermedad Celiaca*

En el caso del estudio de celiaquía, en 188 pacientes se analizó los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular de isotipo IgA e IgG y en algunas pacientes el anticuerpo anti-péptido deamidado de gliadina. Un 11,18% de mujeres con FRR fueron positivas para dicho anticuerpo (Tabla 7). Al igual que ocurre en los casos anteriores, no se observó correlación entre los anticuerpos de la enfermedad celiaca y la expansión de células NK. Una mayor prevalencia de los marcadores de celiaquía se detectó en los casos con FIR respecto al grupo con AR (13,54% (13/96) *versus* 8,70% (8/92)).

Del conjunto de pacientes positivas con FRR (n=21), 17 (9,04%) pacientes fueron positivas para el anticuerpo anti-transglutaminasa de isotipo IgA, 2 (1,06%) mujeres pertenecientes al grupo con FIR presentaron anticuerpos anti-transglutaminasa de isotipo IgG y sólo 2 (1,06%) pacientes fueron positivas para el péptido deaminado de gliadina diagnosticadas con FIR.

En todas las pacientes menos en una se confirmaron antígenos de histocompatibilidad (HLA DQ2 y DQ8). La enfermedad celiaca fue confirmada con posterioridad mediante biopsia duodenal.

Enfermedad Asociada		Categoría Clínica		
Autoimmune	Aborto Recurrente	Fallo de Implantación Recurrente	Fallo Reproductivo Recurrente	
Síndrome Antifosfolípido				
Anti-cardiolipina positivo	17 8,63%	19 10,00%	36 9,30%	
Anti-cardiolipina negativo	180 91,37%	171 90,00%	351 90,70%	
Anti-β2-glicoproteína I positivo	7 3,68%	11 5,92%	18 4,78%	
Anti-β2-glicoproteína I negativo	183 96,32%	175 94,08%	358 95,22%	
Total de casos positivos (n, %)	24 (6,20%)	30 (7,97%)	54 (7,07%)	
Celiaquía				
Anti-Transglutaminasa positivo	8 8,70%	13 13,54%	21 11,18%	
Anti-Transglutaminasa negativo	84 91,30%	83 86,46%	167 88,82%	
Total de casos positivos (n, %)	8 (8,70%)	13 (13,54%)	21 (11,18%)	

Tabla. 7 Distribución de pacientes según categoría clínica y enfermedad autoinmune asociada.

Enfermedad Asociada		Categoría Clínica								
Autoimmune		Aborto Recurrente		Fallo de Implantación Recurrente		Fallo Reproductivo Recurrente				
		NK/NKT-like		NK/NKT-like		NK/NKT-like				
		>12 (n=111)	>10 (n=15)	>12+>10 (n=5)	>12 (n=90)	>10 (n=19)	>12+>10 (n=6)	>12 (n=201)	>10 (n=34)	>12+>10 (n=11)
Síndrome										
Antifosfolípido										
Anti-cardiolipina	positivo	7 6,30%	-	-	9 10,00%	1 5,26%	-	16 7,96%	1 2,94%	-
Anti-β2-glicoproteína I	positivo	5 4,50%	-	-	4 4,44%	1 5,26%	-	9 4,47%	1 2,94%	-
Celiaquía										
Anti-Transglutaminasa	positivo	6 5,40%	3 20,00%	-	5 5,55%	1 5,26%	-	11 5,47%	4 11,76%	-

Tabla. 8. Distribución de pacientes según categoría clínica, expansión de células NK y/o NKT-like y enfermedad autoinmune asociada.

4.2.2.3 Alteraciones del tiroides y fallo reproductivo recurrente

Con el fin de descartar la presencia de algún tipo de desorden tiroideo, se analizaron los anticuerpos anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina y el valor de la hormona TSH y T4 libre.

Como se muestra en la Tabla 9 un 8,30% (n=28) de las mujeres con FRR fueron positivas para el anticuerpo anti-tiroperoxidasa, y un 11,17% (n=37) se evaluaron como positivas para el anticuerpo anti-tiroglobulina (Tabla 9). Sólo 4 pacientes del grupo FRR fueron positivas de manera simultánea para anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina lo que representa un 0,59% del total de mujeres con presencia de anticuerpos tiroides.

Cuando se estudian las entidades clínicas por separado se observa que un 8,78% (n=15) de las mujeres diagnosticadas con AR (n=342) fueron positivas para anti-tiroperoxidasa mientras que un 8,18% (n=14) de pacientes de este mismo grupo lo fueron para anti-tiroglobulina (Tabla 9). Del total de pacientes que se estudiaron en el grupo con AR, 2 mujeres (0,58%) presentaron de manera conjunta anticuerpos anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina,

En el caso del grupo diagnosticado con FIR (n=326), se evaluaron con resultado positivo para anti-tiroperoxidasa a un 7,84% (n=13) de las mujeres, a su vez un 14,37% (n=23) fueron positivas para el anticuerpo anti-tiroglobulina. (Tabla 9). Al igual que se observó en el grupo con AR, en el caso de las pacientes diagnosticadas con FIR 2 de ellas se evaluaron como positivas para los anticuerpos anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina,

Enfermedad Asociada		Categoría Clínica		
Autoinmune	Aborto Recurrente	Fallo de Implantación Recurrente	Fallo Reproductivo Recurrente	
Tiroiditis Autoinmune				
Anti-Tiroperoxidasa positivo	15 8,78%	13 7,84%	28 8,30%	
Anti-Tiroperoxidasa negativo	156 91,22%	153 92,16%	309 91,70%	
Anti-Tirotglobulina positivo	14 8,18%	23 14,37%	37 11,17%	
Anti-Tirotglobulina negativo	157 91,82%	137 85,63%	294 88,83%	
Total de casos positivos (n, %)	29 (8,47%)	36 (11,04%)	65 (9,73%)	
Anti-Tiroperoxidasa positivo +	2	2	4	
Anti-Tirotglobulina positivo	0,58%	0,61%	0,59%	

Tabla.9. Distribución de pacientes según categoría clínica y alteraciones tiroideas halladas.

Para confirmar un posible desorden tiroideo, a cada paciente perteneciente al grupo con FRR se le midieron los valores de la hormona TSH. Así como se muestra en la Tabla 10 se estudió cuantas mujeres presentaban valores de TSH altos ($>2,5\mu\text{U/ml}$) o normales ($\leq 2,5\mu\text{U/ml}$). Un 32,45% ($n=99$) de las mujeres del grupo con FRR se diagnosticaron con valores altos de TSH y el 67,55% ($n=206$) restante presentó valores normales para TSH. Si se desglosan estos resultados en función de la subentidad clínica a la que pertenecen, en el grupo de mujeres con AR 32,45% ($n=49$) se diagnosticaron con TSH alta. Para el grupo con FIR se obtuvieron los siguientes valores un 32,46% de las mujeres registraron valores altos de TSH (Tabla 10).

Enfermedad Asociada	Categoría Clínica		
	Aborto Recurrente ($n=151$)	Fallo de Implantación Recurrente ($n=154$)	Fallo Reproductivo Recurrente ($n=305$)
TSH alta ($>2,5$)	49 32,45%	50 32,46%	99 32,45%
TSH normal ($\leq 2,5$)	102 67,55%	104 67,54%	206 67,55%

Tabla.10. Distribución de pacientes según categoría clínica y valor de la hormona TSH $\mu\text{U/ml}$.

Con todos los datos que se obtuvieron en los análisis anteriores, se analizó la combinación de las tres variables estudiadas anteriormente por separado (anti-tiroperoxidasa, anti-tiroglobulina y el valor de la hormona TSH). Así, se pudo observar que 13/337 pacientes (3,85%) del grupo FRR presentó valores de TSH superiores a $2,5\mu\text{U/ml}$ y anti-tiroperoxidasa positiva y 10/331 mujeres (3,02%) del grupo con FRR fueron positivas para anti-tiroglobulina y TSH alta (Tabla 11). En el grupo con FIR se encontró una mujer que expresó de manera simultánea anti-tiroperoxidasa, anti-tiroglobulina y que además registró valores altos de TSH. Ninguna paciente de esta serie presentó hipertiroidismo autoinmune (enfermedad de Graves-Basedow).

Enfermedad Asociada	Categoría Clínica		
Autoinmune	Aborto Recurrente TSH alta (>2,5)	Fallo de Implantación Recurrente TSH alta (>2,5)	Fallo Reproductivo Recurrente TSH alta (>2,5)
Tiroiditis Autoinmune			
Anti-Tiroperoxidasa positivo	6 3,50%	7 4,09%	13 3,85%
Anti-Tioglobulina positivo	2 1,20%	8 5,00%	10 3,02%
Anti-Tiroperoxidasa positivo + Anti-Tioglobulina positivo	-	1 0,30%	1 0,15%

Tabla.11. Distribución de pacientes según categoría clínica, presencia de anticuerpos antitiroideos (anti-tiroperoxidasa y anti-tioglobulina) y valor de la hormona TSH.

4.2.3 Distribución de las pacientes con FRR por categoría clínica, expansión de células NK y NKT-like.

Al igual que se hizo con las variables anteriores, también se quiso evaluar, cuantas de aquellas mujeres presentaron expansión de células NKT-like (>10%). De este modo, como se refleja en la Tabla 12, un 11,37% de las mujeres con FRR (n=299) presentaron expansión de células NKT-like. Si analizamos los grupos por separado, en el caso de las mujeres diagnosticadas con AR (n=146) un 10,27% (n=15) manifestó expansión de la población de células NKT-like. Sin embargo, un 12,41% (n=19) de las mujeres incluidas en el grupo FIR (n=153) se determinó la expansión de las células NKT-like.

Enfermedad Asociada	Categoría Clínica		
Expansión de células NKT-like	Aborto Recurrente (n=146)	Fallo de Implantación Recurrente (n=153)	Fallo Reproductivo Recurrente (n=299)
NKT-like ($\geq 10\%$)	15 10,27%	19 12,41%	34 11,37%
NKT-like (<10%)	131 89,73%	134 87,59%	265 88,63%

Tabla.12. Distribución de pacientes según categoría clínica y presencia de expansión de células NKT-like >10% de los linfocitos totales.

4.3 Correlaciones entre la población de NK totales y diferentes variables inmunológicas, trombofílicas y hormonales.

No se encontraron correlaciones en el estudio basal (previamente a la gestación) entre las NK y ninguna de las variables recogidas en el estudio (anticuerpos anti-cardiolipina (ACA), anti- β 2 glicoproteína I(A β 2), anti-tiroperoxidasa (TPO), anti-tiroglobulina (Tg), anti-transglutaminasa (tGT), mutación del gen del Factor V, Factor II, Metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), descenso del componente 4 del complemento (C4) y elevación de la hormona estimulante del tiroides (THS), ni en el grupo de abortos recurrente ni en el grupo de fallo de implantación recurrente.

4.4 Estudio de las poblaciones linfocitarias de células NK/NKT-like.

Para la primera parte del estudio se evaluaron 318 mujeres con fallo reproductivo recurrente, siendo 152 diagnosticadas de aborto recurrente (AR) y 166 de fallo de implantación recurrente (FIR), según los criterios previamente expuestos. El grupo control consistió en cincuenta mujeres sanas de fertilidad demostrada y con ciclos menstruales regulares, a las cuales se les evaluó en la fase menstrual y en la fase periovulatoria del ciclo menstrual.

4.4.1 Estudio de la población NK a lo largo del ciclo menstrual en controles sanos.

Una vez analizadas cada una de las muestras obtenidas en el grupo control en los dos puntos, menstrual y periodo periovulatorio, no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos en las células NK totales ni en ninguna de sus subpoblaciones, ni en el grupo de células NKT-like entre las fases menstrual y periovulatoria durante el ciclo menstrual en el grupo de controles sanos. Estos datos coinciden con los publicados por Pantazi et al ¹⁹⁴. En análisis sucesivos se utilizaron cada uno de los datos como independientes. (Figura12)

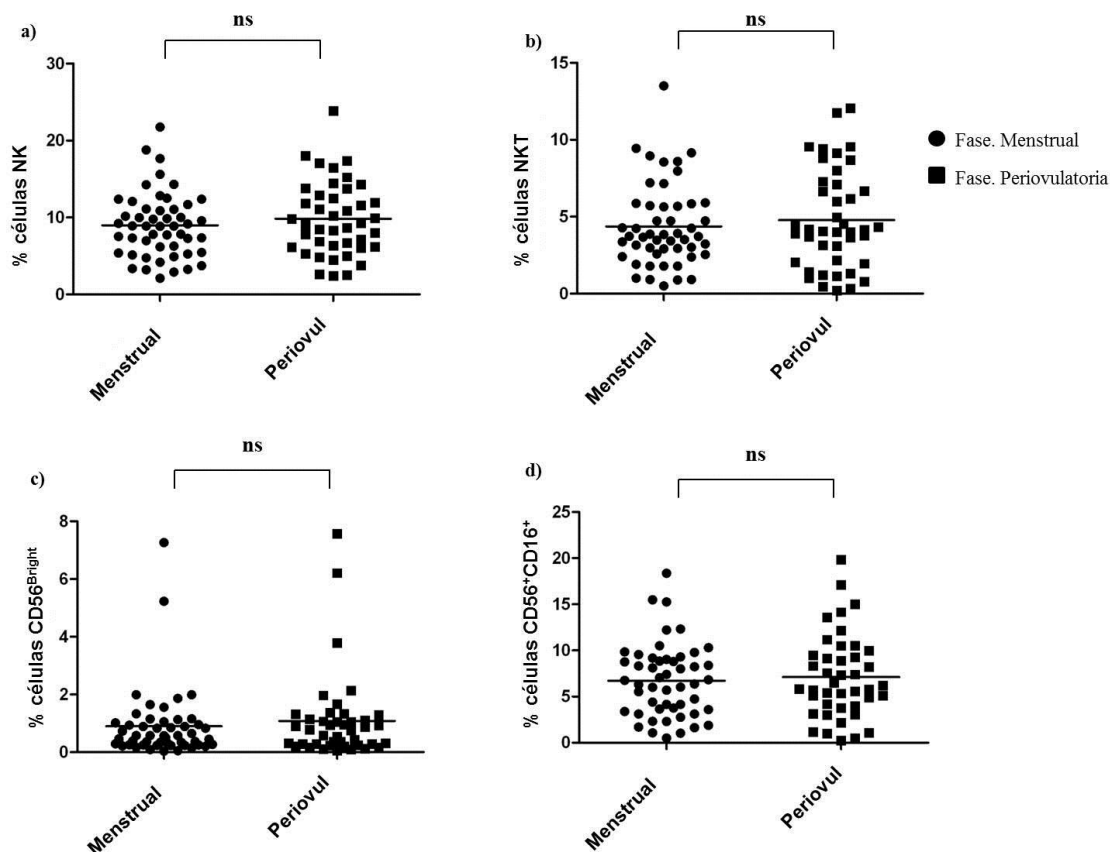


Figura. 12. Subpoblaciones de células NK y NKT-like circulantes en dos puntos del ciclo menstrual. No se observaron diferencias significativas ni en el grupo de células NK, NKT-like ni en las subpoblaciones de NK entre la fase basal y la fase periovulatoria del ciclo menstrual. a) % células NK, b) % células NKT-like, c) % células CD56^{Bright}, d) % CD56⁺CD16⁺ en sangre periférica en el grupo control. Cada punto representa una mujer del grupo control.

4.5 Análisis de las células NK totales, subpoblaciones de células NK y NKT-like de sangre periférica en pacientes con FRR y controles

Cuando se analizaron las poblaciones señaladas anteriormente, se observó que el porcentaje total de células NK era significativamente mayor en los casos de FRR ($13,11 \pm 5,98$) respecto a controles ($9,37 \pm 4,43$) ($p < 0.0001$). La subpoblación de células NK CD56^{dim}CD16⁺ presentó un porcentaje significativamente mayor en los casos de FRR ($10,58 \pm 5,67$) respecto al grupo control ($6,90 \pm 4,21$) ($p < 0.0001$).

Sin embargo, no se observaron diferencias entre ambos grupos para la subpoblación de células NK CD56^{bright} ni para las células NKT-like.

Para confirmar que las diferencias observadas cuando se trata globalmente los casos de FRR se reproducen al analizar por separado AR y FIR, se repitió el mismo análisis para

ambos grupos. Se observó que el porcentaje de células NK totales es significativamente mayor tanto en los casos de AR ($p < 0.0001$) como para los de FIR ($p < 0.0001$) comparado con valores obtenidos en controles sanos (Tabla 13).

Cuando se compararon las subpoblaciones de células NK, se observó que las células $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ en los grupos AR y FIR eran significativamente más elevados que en controles sanos ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$ respectivamente).

Al igual que en el caso de FRR, tampoco se encontraron diferencias significativas para la subpoblación de células NK $CD56^{\text{bright}}$ ni para las células NKT-like en los pacientes con AR y FIR. (Tabla 13)

Población	FRR	AR	FIR	Control
% células NK	13,11±5,98*** 12,00 (8,56)	13,35±5,60*** 13,00 (7,65)	12,88±6,31*** 12,00 (9,00)	9,37±4,43 8,90 (5,90)
% $CD56^+$ $CD16^+$	10,58±5,67*** 9,46 (7,98)	9,21±4,67* 8,77 (7,77)	11,26±6,02*** 10,05 (9,96)	6,90±4,21 6,34 (5,56)
% $CD56^{\text{bright}}$	0,71±0,50 0,70 (0,65)	0,79±0,63 0,80 (0,64)	0,67±0,43 0,61 (0,65)	0,98±1,35 0,58 (0,83)
% células NKT-like	4,80±4,03 4,00 (4,00)	5,11±4,09 4,00 (4,90)	4,58±3,99 3,34 (4,42)	4,55±2,92 3,90 (3,70)

Tabla.13. Porcentajes de células NK, NKT-like y subpoblaciones de NK en mujeres con fallo reproductivo recurrente (FRR), aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y grupo control. Los valores están expresados como media±desviación standard y mediana con rango intercuartílico (percentil 75- percentil 25) * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ respecto al grupo control.

4.5.1 Factores de Riesgo para Fallo Reproductivo Recurrente

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de AR y FIR, se establecieron puntos de corte de las distintas poblaciones linfocitarias para FRR en su conjunto mediante el uso de curvas ROC. Se estableció como punto de corte aquel valor que representa la mejor combinación de especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de FRR.

Se analizaron de manera individual las variables edad, %NK totales, $CD56^{\text{dim}}CD16^+$, $CD56^{\text{bright}}$, NKT-like, para establecer posibles factores de riesgo para FRR.

Para la variable edad se eligió el valor de 35 años, con sensibilidad y especificidad de 74.3% y 75.3% respectivamente. Las mujeres mayores de 35 años presentan 6.9 veces

más riesgo de FRR que los controles, con un Hazard Ratio 95% e intervalo de confianza (IC): 3.98-12.67.

Para la población de células NK totales, se estableció como el mejor punto de corte el valor del 18%, con un valor predictivo positivo (VPP) del 93.2% y un valor predictivo negativo del 27.2%. Las pacientes con células NK superiores al 18% tiene un riesgo 5.1 veces mayor (Hazard Ratio 95%, IC: 1.81-14.62) de sufrir fallo gestacional en la siguiente gestación. Mediante análisis de regresión múltiple Cox, se estableció que las células NK son un factor de riesgo de fallo reproductivo independiente de la edad.

Por último, para las células CD56^{dim}CD16⁺ se estableció un punto de corte del 13% con una sensibilidad del 31.3% y una especificidad del 91.3% de ocurrencia de aborto en la siguiente gestación.

Cuando se evaluó el efecto de las células CD56^{bright} y NKT-like, se observó que el riesgo de fallo gestación se asocia con los valores de estas subpoblaciones, siendo los puntos de corte para cada una de ellas de 1% de las células NK y 3% de los linfocitos, respectivamente. (Tabla 14)

Variable	Punto de Corte	Área	Sensibilidad	Especificidad	Odds ratio	VPP	VPN
Edad Materna (años)	35	79%	74,3%	75,3%	6,90	90,7%	41,6%
CD56 ⁺ CD16 ⁺ %	13	69%	31,3%	91,3%	4,70	78,9%	56,0%
Total NK%	18	68%	19,0%	95,7%	5,10	93,2%	27,2%
NKT-like%	3	51%	42,5%	69,6%	1,69	13,4%	91,6%
CD56 ^{Bright} %	1	50%	90,3%	30,4%	4,07	12,6%	96,6%

Tabla. 14. Punto de corte para cada una de las variables estudiadas. Valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN).

4.6 Modelo de árbol de decisión para fallo gestacional recurrente

Debido a que no se observan diferencias significativas entre los grupos de pacientes con AR y FIR, se utilizó como modelo predictivo en la práctica clínica que está construido a partir de todos los pacientes en su conjunto (FRR).

El árbol comienza con 318 pacientes y 92 controles sanos. La primera variable que se presenta con mayor fuerza es la edad, separando a la población en ≤ 35 años y > 35 años. Si se selecciona el grupo de mujeres menores de 35 años, se observa que la siguiente

variable a tener en cuenta es el porcentaje de células NK totales. Para facilitar la lectura del árbol se ha suprimido el nodo 3 y se ha representado como una triple ramificación, que comprende un intervalo que va desde 13% al 24% por tanto en mujeres ≤ 35 años que presenten un 13% de células NK el riesgo de sufrir una pérdida fetal es menor a la de la población general y estaría en un 2.5%. Para aquellas mujeres que se encuentran entre 13-24% de células NK el riesgo es ligeramente superior al de la población general (12%). Sin embargo, el grupo de mujeres ≤ 35 años y con células NK $> 24\%$ presentan un riesgo del 100% de nueva pérdida fetal.

Siguiendo con la mitad del árbol que corresponde a la mujeres mayores de 35 años, observamos que la mejor variable predictiva es la subpoblación de células NK $CD56^+CD16^+$, mientras que el porcentaje de NK totales pasa a ser un marcador subrogado. Esto se explica por el hecho de que en mujeres mayores de 35 años el porcentaje de $CD56^+CD16^+$ suponen un 84% del total de células NK, mientras que en los casos de controles sanos las células $CD56^+CD16^+$ representan un 55.6% de las NK totales. En este caso, es el nodo 6 quien representa la población con mayor riesgo: mujeres > 35 años y con células $CD56^+CD16^+ > 13\%$ con un riesgo del 100% de nuevo fallo gestacional (Figura 13).

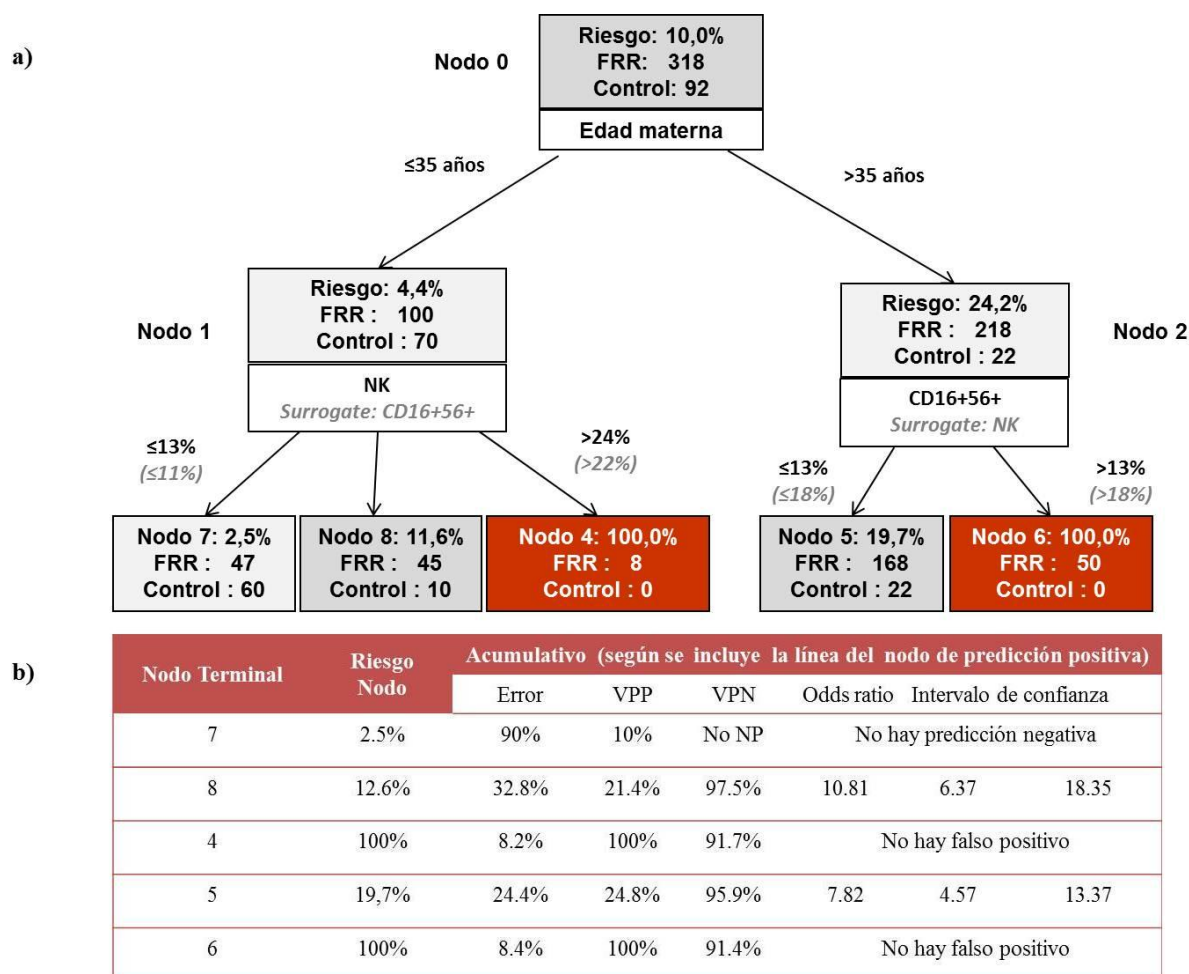


Figura. 13. Árbol de decisión predictivo de riesgo de fallo reproductivo. Calculado sobre 318 pacientes y 92 controles. a) Modelo de árbol de decisión. b) principales características de los nodos terminales. El riesgo del nodo representa el porcentaje de sufrir fallo reproductivo en la población general que reúna las características del nodo. Valor predictivo positivo (VPP) y valor negativo positivo (VNP)

4.6.1 Modelo de árbol de decisión para pacientes con fallo de implantación recurrente.

Al estudiar por separado ambas entidades clínicas, el árbol obtenido para los casos de FIR presenta la misma estructura y define los mismos factores de riesgo que en el árbol de FRR, es decir, la edad materna, el porcentaje de células NK y el porcentaje de células CD56⁺CD16⁺.

El árbol comienza con 166 pacientes y 92 controles sanos. La primera variable que se presenta con mayor fuerza es la edad, separando a la población en ≤ 34 años y >34 años. Si nos centramos primero en el grupo de mujeres menores de 34 años se observa que es un nodo terminal en el cual el riesgo del grupo de mujeres que se engloban en él es del 3.7% de nueva pérdida gestacional, menor que el descrito para la población general.

Siguiendo con la mitad del árbol que corresponde a la mujeres mayores de 34 años, observamos que la mejor variable predictiva al igual que hemos comentado para el caso de FRR en su conjunto es la subpoblación de células NK CD56⁺CD16⁺, mientras que el porcentaje de células NK totales pasa a ser un marcador subrogado. Como hemos comentado anteriormente, esto se debe al aumento de la subpoblación de células CD56⁺CD16⁺ respecto al total de NK en el caso de las mujeres con FIR respecto a los controles. En este caso, es el nodo 4 el que representa la población de >34 años y células CD56⁺CD16⁺ $>13\%$ o NK $>18\%$ que presentan un riesgo del 100% de nueva pérdida gestacional. (Figura 14)

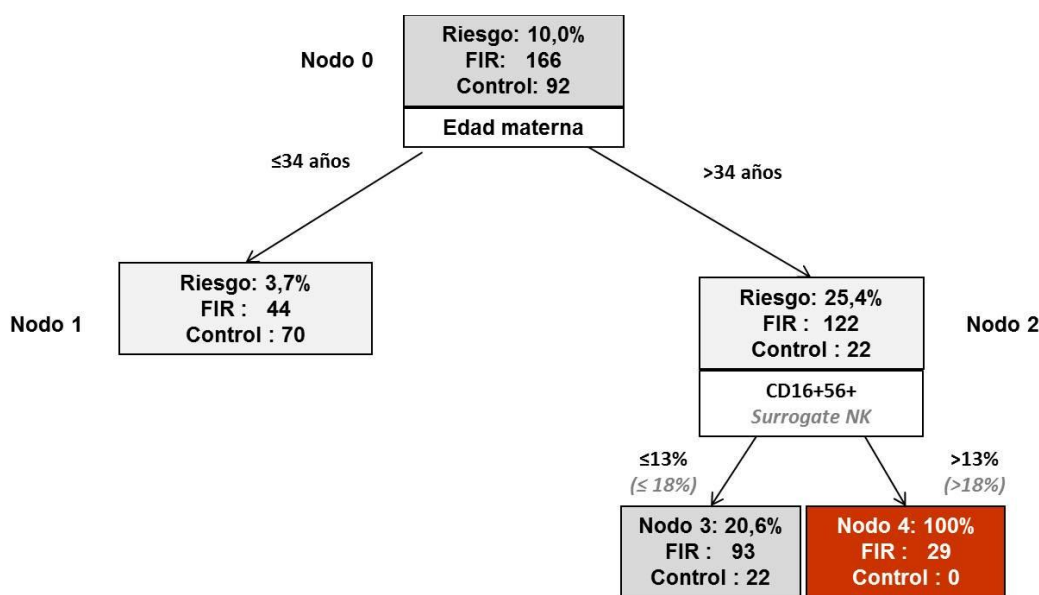


Figura. 14. Árbol de decisión predictivo de fallo de implantación en pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR).

4.6.2 Modelo de árbol de decisión para pacientes con fallo de implantación recurrente.

En los casos de AR, el árbol de decisión se bifurca en primer lugar según la variable edad y como marcador subrogado de la edad aparecen las células NK. La segunda variable que aparece provocando una nueva bifurcación en la estructura del árbol es el % de células NKT-like.

El árbol comienza con 152 pacientes y 92 controles sanos. La primera variable que se presenta con mayor fuerza es la edad, separando a la población en ≤ 32 años y > 32 años. En este caso, el punto de corte obtenido para las pacientes con AR es menor que para los casos de FRR y FIR. A diferencia de lo obtenido para los modelos anteriores, el porcentaje de células NK aparece como variable subrogada a la edad. Si nos centramos primero en el grupo de mujeres menores de 32 años, se observó que es un nodo terminal en el cual el riesgo de sufrir un nuevo aborto en este grupo de mujeres es del 1.9%, inferior al de la población general.

Siguiendo con la mitad del árbol que corresponde a la mujeres mayores de 32 años y con un porcentaje de células NK $> 10\%$, se observa que la mejor variable predictiva es el porcentaje de células NKT-like, cuyo punto de corte es el 10% de los linfocitos totales. En este caso es el nodo 4 el que representa la población con mayor riesgo mujeres > 32 años y células NKT-like $> 10\%$ que presentan un riesgo del 100% de nueva pérdida gestacional. (Figura 15)

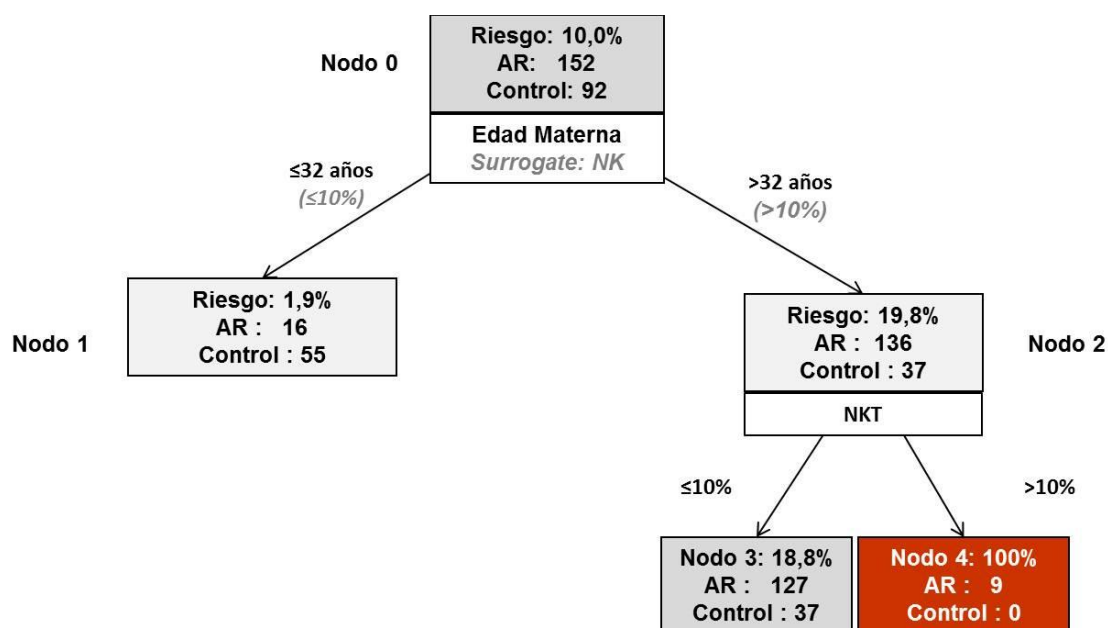


Figura.15. Árbol de decisión predictivo de aborto en pacientes con abortos recurrentes (AR).

4.7 Valoración de la seguridad del tratamiento con gammaglobulina intravenosa.

Se utilizaron los preparados comerciales (Privigen® al 10% y Flebogamma® al 5%) según el criterio del médico prescriptor. En general se prefieren preparaciones al 10% por el menor volumen de medicamento a infundir.

Al finalizar cada dosis del tratamiento, se registraron todas las reacciones adversas medicamentosas (RAM) ocurridas durante el mismo. Así, del total de pacientes sometidas a GGIV (n=157) sólo un 7% presentó efectos adversos leves en los que se incluyen, cefalea; astenia y sensación de distermia. Estos efectos se registraron en las primeras 48h después de la infusión. Sólo un 2% presentó efectos moderados, cefalea intensa en 3 casos y en uno de ellos se registró una reacción cutánea (Tabla 15). En general, estas reacciones se produjeron en las dos primeras infusiones y se fue generando tolerancia en las pacientes que las presentaron. La paciente que presentó una reacción cutánea se cambió de preparado, con buena tolerancia. El 91% (n= 142) no presentó ningún tipo de efecto adverso. Sólo una paciente con reacción cutánea a la infusión requirió cambio de preparado (de Privigen® a Flebogamma®), siendo tolerada sin incidencias. Ninguna paciente interrumpió el tratamiento debido a RAM.

Efectos Adversos del tratamiento con GGIV		
Tipo	Nº de Pacientes	%
Leves	11	7,0%
Moderados	3	2,0%
Graves	-	-
Ausencia	142	91,0%

Tabla.15. Efectos adversos del tratamiento con gammaglobulina intravenosa (GGIV) en pacientes con fallo reproductivo recurrente.

Como medida de profilaxis en los casos que presentaron reacción adversa, se optó por reducir la velocidad de infusión y la administración de fármacos tales como paracetamol, post-infusión.

4.8 Evolución del porcentaje de células NK totales a lo largo de la gestación

De un total de 86 mujeres con FRR (41 mujeres con AR y 45 mujeres con FIR) se estudió la evolución del porcentaje de células NK, en cuatro puntos diferentes, basal (antes del comienzo de la gestación), primer trimestre, segundo trimestre y tercer trimestre, durante el tratamiento con GGIV (Figura 16).

A lo largo del tratamiento se observa un descenso generalizado del porcentaje de células NK totales. Cuando se comparó cada trimestre con el punto basal se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de células NK en el punto basal $15,67 \pm 6,53$ y cada uno de los trimestres del embarazo. Así el porcentaje de células NK totales en el primer trimestre presentó un valor medio de $12,45 \pm 4,88\%$. También se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de células NK del punto basal y el segundo trimestre, donde el porcentaje medio de NK totales es del $11,18 \pm 4,43\%$ ($p < 0.0001$). Pero es cuando se comparó el punto basal con el tercer trimestre ($10,18 \pm 3,97\%$) donde se registró una diferencia mayor en este porcentaje, con una $p < 0.0001$ (Tabla 16)

Evolución del porcentaje de células NK totales en pacientes con FRR (n=86)				
Población	Basal	1 Trimestre	2 Trimestre	3 Trimestre
% células NK totales	$15,67 \pm 6,53$	$12,45 \pm 4,88^{***}$	$11,18 \pm 4,43^{***}$	$10,18 \pm 3,97^{***}$
	14 (8)	12 (5,25)	10 (6,5)	9 (5)

Tabla. 16. Evolución del porcentaje de células NK totales en pacientes con FRR durante cuatro momentos diferentes (basal, 1trimestre, 2trimestre y 3trimestre). Los valores están expresados como media±desviación estándar y mediana con rango intercuartílico (percentil 75- percentil 25) *** $p < 0.0001$, respecto al basal.

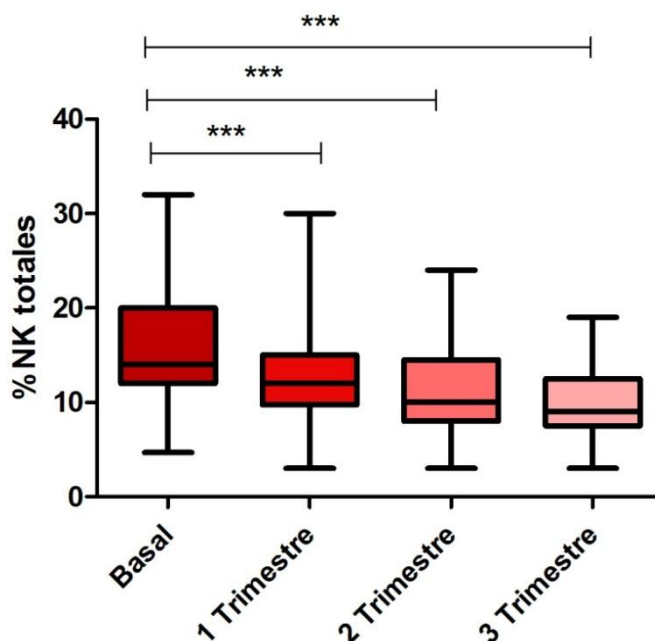


Figura.16. Evolución del porcentaje de células NK totales en pacientes con FRR durante cuatro momentos diferentes (basal, 1 trimestre, 2 trimestre y 3 trimestre). Cada caja representa la mediana (línea gruesa del medio), y los percentiles 25 y 75. Las barras de error representan los valores máximo y mínimo de cada grupo. *** $p < 0.0001$ respecto al basal.

4.8.1 Comparación del porcentaje de células NK entre pacientes con AR y FIR en cuatro puntos a lo largo de la gestación.

Tras estudiar la evolución del porcentaje de células NK a lo largo de la gestación en aquellas pacientes con FRR que fueron tratadas con GGIV, se comparó entre los grupos de AR y FIR los porcentajes de células NK en los mismos cuatro puntos (basal, primer trimestre, segundo trimestre y tercer trimestre).

Los resultados que se obtuvieron de este análisis no reflejan diferencias significativas en el porcentaje de células NK en ningún de los cuatro puntos de estudio entre ambos grupos (AR y FIR) (Figura 17).

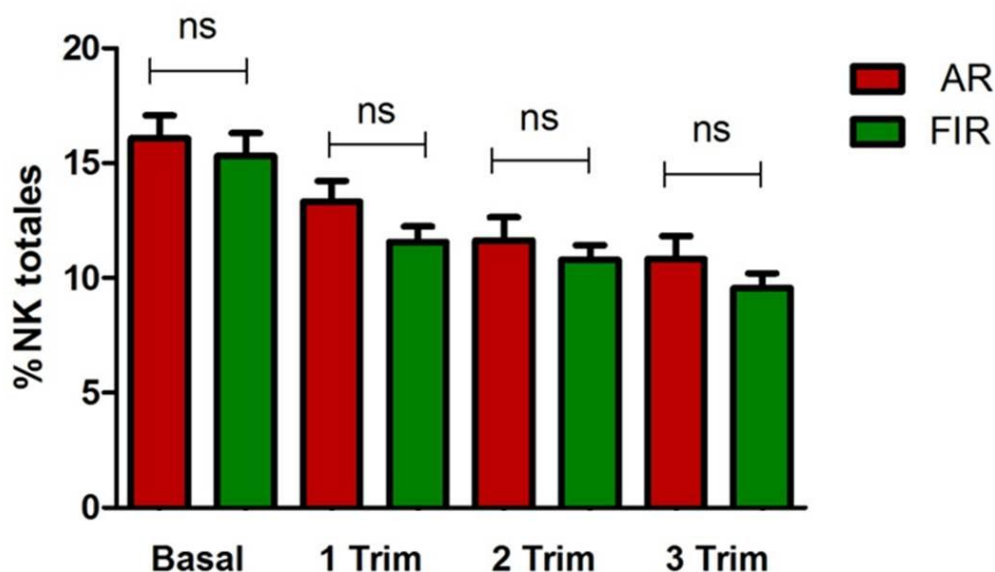


Figura.17. Evolución del porcentaje de células NK en los grupos con aborto recurrente (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR). No se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos. n.s (no significativo).

4.9 Efecto clínico del tratamiento con gammaglobulina intravenosa.

Para valorar la tasa de gestación y la tasa de recién nacido vivo, se dividió a las pacientes en diferentes grupos, según pertenecieran al grupo de AR o FIR y según el tipo de tratamiento que se les haya administrado. Así, en el caso de los tratamientos tendremos seis grupos: sin medicación, heparina de bajo peso molecular (HBPM), ácido acetilsalicílico (AAS), AAS+HBPM, AAS+GGIV y por último AAS+HBPM+GGIV.

La decisión de administrasr el tratamiento con GGIV se hizo según el criterio americano que establece como expansión de células NK un porcentaje $\geq 12\%$ de los linfocitos totales y para el caso de las células NKT-like $\geq 10\%$.

4.9.1 Tasa de Recién Nacido Vivo en el Grupo de Pacientes con Aborto Recurrente.

Para el grupo de AR (n=109) sólo se valoró la variable tasa de recién nacido vivo (RNV), ya que en este grupo de pacientes, la gestación se produjo de forma natural y el tratamiento con GGIV se aplicó en el momento en el que a la paciente se le confirmó su estado de gestación clínica positivo. Según se representa en el Tabla 17 se clasificó a las mujeres incluidas en el grupo con AR según el tipo de tratamiento que habían recibido a

lo largo del periodo de gestación y si al final de la misma se obtuvo recién nacido vivo. Así, se observó que la tasa de RNV más alta se obtuvo en aquellos grupos de pacientes que fueron tratadas con AAS+GGIV, con una tasa de RNV del 97,9% (n=48) y con AAS+HBPM +GGIV una tasa del 94,1% (n=34).

El análisis se repitió incluyendo sólo la variable GGIV. De este modo, el tamaño muestral aumenta (n=121), ya que el modelo incluye a todas las pacientes que presentan los datos de GGIV y RNV sin tener en cuenta los valores de las otras variables. Del mismo modo se obtuvo una tasa de RNV del 96,3% (n=82) en aquellas pacientes que fueron tratadas con GGIV *versus* las no tratadas con GGIV que presentaron un 30.8% (n=39) de éxito (Tabla 17). En una serie amplia de mujeres con AR y expansión de células NK.

De todas las gestaciones del grupo con AR (n=121) en dos casos (1,65%) se registraron partos gemelares.

Recien Nacido Vivo entre las mujeres embarazadas pertenecientes al grupo de AR					
Tratamiento \ RNV	NO	SI	Total	Tasa de RNV	
<i>Sin medicación</i>	4	2	6	33,3%	
<i>HBPM</i>	3	0	3	0,0%	
<i>AAS</i>	5	3	8	37.5%	
<i>AAS+HBPM</i>	7	3	10	30.0%	
<i>AAS+GGIV</i>	1	47	48	97.9%	
<i>AAS+HBPM+GGIV</i>	2	32	34	94.1%	
Total	22	87	109		
<i>Sin GGIV</i>	27	12	39	30.8%	
<i>Con GGIV</i>	3	79	82	96.3%	
Total	30	91	121		

Tabla. 17. Tasa de recién nacido vivo (RNV) entre las mujeres embarazadas pertenecientes al grupo de Abortos Recurrentes (AR). HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico)

4.9.2 Tasa de gestación en el grupo de pacientes Fallo de Implantación Recurrente.

En este grupo de pacientes (n=129) se repitió la misma estrategia seguida para el grupo de AR. Las pacientes se dividieron según el tratamiento recibido y en función del éxito o fracaso gestacional, como se representa en la Tabla 16. De este modo se puede observar que en el grupo de AAS+GGIV hay un 100% (n=51) de tasa de gestación,

mientras en el grupo que incluye a las pacientes tratadas con AAS+HBPM+GGIV la tasa de gestación es del 82,1% (n=28).

Del mismo modo que en el caso anterior se analizó la tasa de gestación teniendo en cuenta únicamente la variable GGIV. Para este caso, la tasa de gestación en aquellas mujeres que fueron tratadas con GGIV fue del 93.8% (n=80) (Tabla 18).

Gestación entre todas las mujeres del grupo de FIR				
Gestación	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
Tratamiento				
<i>Nada</i>	1	0	1	0,0%
<i>HBPM</i>	-	-	-	-
<i>AAS</i>	12	4	16	25,0%
<i>AAS+HBPM</i>	23	10	33	30.3%
<i>AAS+GGIV</i>	0	51	51	100,0%
<i>AAS+HBPM+GGIV</i>	5	23	28	82.1%
Total	41	88	129	
<i>Sin GGIV</i>	62	22	84	26.2%
<i>Con GGIV</i>	5	75	80	93,8%
Total	67	97	164	

Tabla. 18. Tasa de gestación entre todas las mujeres pertenecientes al grupo de Fallo de Implantación Recurrente (FIR). HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico)

4.9.2.1 Tasa de gestación en el grupo de pacientes con Fallo de Implantación Recurrente con ovodonación o sin ovodonación.

Dentro del grupo de pacientes con FIR, que se sometieron a técnicas de fecundación *in vitro*, se evaluó la tasa de gestación entre la mujeres que habían recibido ovodonación (ovulo de una donante) y las que no. De este modo, se obtuvo una tasa de gestación en el grupo sin ovodonación del 57,5% mientras que en el grupo de mujeres que recibieron ovodonación se registró un porcentaje del 72,1% (Tabla 19)

Gestación entre todas las mujeres del grupo de FIR				
<div><div></div><div>Gestación</div></div>	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
FIV				
Sin Ovodonación	48	65	113	57,5%
Con Ovodonación	12	31	43	72,1%

Tabla.19. Tasa de gestación entre las mujeres pertenecientes al grupo de Fallo de Implantación Recurrente (FIR) que se sometieron a técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) clasificadas por la presencia o ausencia de ovodonación.

Posteriormente se evaluó en este grupo de mujeres el efecto de la GGIV. El grupo que no recibió ovodonación se estratificó en tres grupos de edades (<35 años, entre 35-40 años y >40 años).

Como se muestra en la Tabla 20, cuando no se trató con GGIV, la tasa de gestación en el grupo con ovodonación (36,8%) fue mayor que en cualquiera de los grupos de pacientes sin ovodonación independientemente del grupo de edad. En ninguno de los casos la tasa de gestación supera el 40%.

Sin embargo, cuando se trató con GGIV, la tasa de gestación obtenida en todos los grupos fue superior al 85%, poniéndose de manifiesto el efecto positivo que tiene la GGIV sobre la tasa de gestación.

Gestación entre todas las mujeres del grupo de FIR sin GGIV				
<div><div></div><div>Gestación</div></div>	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
FIV				
Sin Ovodonación				
<35 años	11	3	14	21,4%
35-40 años	23	10	33	30,3%
>40 años	8	2	10	20,0%
Con Ovodonación	12	7	19	36,8%
Total	54	22	76	
Gestación entre todas las mujeres del grupo de FIR con GGIV				
<div><div></div><div>Gestación</div></div>	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
FIV				
Sin Ovodonación				
<35 años	1	11	12	91,7%
35-40 años	3	26	29	89,7%
>40 años	1	12	13	92,3%
Con Ovodonación	0	24	24	100%
Total	5	73	78	

Tabla.20. Tasa de gestación entre todas las mujeres del grupo con fallo de implantación recurrente (FIR), clasificadas por la utilización o no de ovodonación en la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) y en función de la aplicación o no de tratamiento con GGIV.

4.9.3 Tasa de Recién Nacido Vivo en el grupo de pacientes con Fallo de Implantación Recurrente.

En este análisis se incluyó a todas las mujeres que forman parte del grupo FIR y de las cuales se tenían datos de las variables de estudio (n=129). Al igual que ocurre en el grupo de AR es en los casos donde se trató con AAS+GGIV o AAS+HBPM+GGIV donde se encuentra una tasa de RNV mayor (84,3% y 71,4%) respectivamente (Tabla 21). Sin embargo, si se compara la tasa de RNV del grupo de FIR con el grupo de AR vemos que los porcentajes de tasa de RNV en el grupo de FIR aun siendo altos son más bajos que los obtenidos para las pacientes de AR.

Asimismo, cuando se realizó el análisis incluyendo únicamente la variable GGIV, el número de pacientes incluidas aumenta siendo para este análisis de 164 mujeres. En este caso, la tasa de RNV que se obtuvo fue del 80,0% (Tabla 21).

Recien Nacido Vivo entre todas las mujeres pertenecientes al grupo de FIR				
Tratamiento \ RNV	NO	SI	Total	Tasa de RNV
<i>Nada</i>	1	0	1	0,0%
<i>HBPM</i>	-	-	-	-
<i>AAS</i>	14	2	16	12,5%
<i>AAS+HBPM</i>	27	6	33	18,2%
<i>AAS+GGIV</i>	8	43	51	84,3%
<i>AAS+HBPM+GGIV</i>	8	20	28	71,4%
Total	58	71	129	
<i>Sin GGIV</i>	69	15	84	17,9%
<i>Con GGIV</i>	16	64	80	80,0%
Total	85	79	164	

Tabla.21. Tasa de recién nacido vivo (RNV) entre todas las mujeres pertenecientes al grupo de Fallo de Implantación Recurrente (FIR). HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico).

En este grupo de pacientes (n=164) se registraron 10 partos gemelares (6,09%) y 1 de trillizos (0,61%).

4.9.3.1 Tasa de recién nacido vivo en el grupo de pacientes Fallo de Implantación Recurrente con ovodonación o sin ovodonación.

Del mismo modo que se analizó la tasa de gestación, también se estudió la tasa de recién nacido vivo en mujeres con FIR distinguiendo entre aquellas que habían recibido ovodonación y las que no lo recibieron. Los datos que se muestran en la Tabla 22 ponen de manifiesto que la tasa de RNV en el grupo ovodonación es del 62,8% frente al 46,0% en el grupo sin ovodonación.

Recién Nacido Vivo entre todas las mujeres pertenecientes al grupo de FIR				
<i>Fecundación in vitro</i>	NO	SI	Total	Tasa de RNV
<i>Sin Ovodonación</i>	61	52	113	46,0%
<i>Con Ovodonación</i>	16	27	43	62,8%

Tabla.22. Tasa de recién nacido vivo entre todas las mujeres pertenecientes al grupo de Fallo de Implantación Recurrente (FIR) que se sometieron a técnicas de fecundación *in vitro* clasificadas por la presencia o ausencia de ovodonación.

Cuando no se somete a las pacientes a tratamiento con GGIV la mayor tasa de recién nacido vivo se registra en el grupo con ovodonación siendo de un 31,6%. Al igual que ocurre con la tasa de gestación, cuando se aplica GGIV en el tratamiento las tasas de recién nacido vivo aumentan de manera significativa en todos los grupos siendo superiores al 70% (Tabla 23)

Recien Nacido Vivo entre todas las mujeres del grupo de FIR sin GGIV				
<div><div></div><div>RNV</div></div>	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
FIV				
Sin Ovodonación				
<35 años	13	1	14	7,1
35-40 años	27	6	33	18,2
>40años	8	2	10	20,0
Con Ovodonación	13	6	19	31,6
Total	61	15	76	
Recien Nacido Vivo entre todas las mujeres del grupo de FIR con GGIV				
<div><div></div><div>RNV</div></div>	NO	SI	Total	Tasa de Gestación
FIV				
Sin Ovodonación				
<35 años	3	9	12	75,0
35-40 años	8	21	29	72,4
>40años	1	12	13	92,3
Con Ovodonación	3	21	24	87,5
Total	15	63	78	

Tabla.23. Tasa de recién nacido vivo entre todas las mujeres del grupo con fallo de implantación recurrente (FIR), clasificadas por la utilización o no de ovodonación en la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) y en función de la aplicación o no de tratamiento con GGIV.

4.9.4 Comparación de la tasa de gestación entre criterio americano y según árbol de decisión en pacientes del grupo FIR.

Como se mencionó anteriormente, la decisión de aplicar el tratamiento con GGIV a las pacientes se hizo según el criterio americano que establece como expansión de células NK un porcentaje $\geq 12\%$ y para el caso de las células NKT-like $\geq 10\%$. Como se explica en la sección 4.1.4 del apartado de resultados de la presente memoria. Se ha diseñado un modelo de decisión que establece nuevos puntos de corte para la variable NK, (células NK totales $\geq 24\%$ para las pacientes menores de 35 años y células NK totales $\geq 18\%$ para las pacientes mayores de 35 años) manteniéndose el porcentaje de NKT-like $\geq 10\%$.

En el caso de las pacientes hubieran sido seleccionadas según los criterios del árbol de decisión la tasa de gestación para el grupo de mujeres pertenecientes al grupo de FIR hubiera sido del 100% con AAS+GGIV y del 81,8% para AAS+HBPM+GGIV.

Como se muestra en la Figura 18, no se observan diferencias significativas entre ambos criterios, siendo los valores obtenidos muy similares.

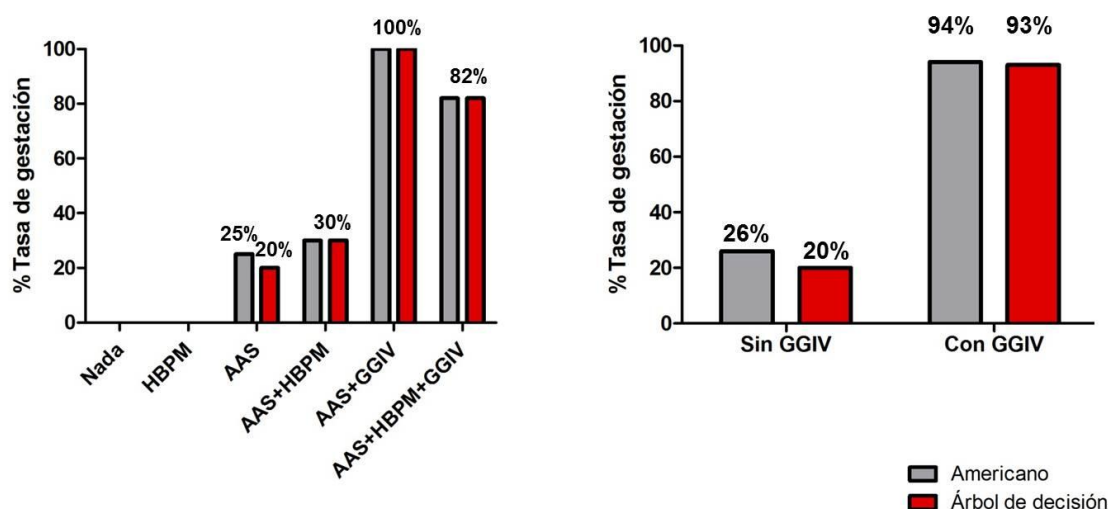


Figura.18. Comparación de la tasa de gestación según criterio de selección en pacientes pertenecientes al grupo de fallo de implantación recurrente (FIR). HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico).

4.9.5 Comparación de la tasa de recién nacido vivo entre criterio americano y árbol de decisión en pacientes del grupo FIR.

Al comparar la tasa de RNV en todas las mujeres del grupo con FIR entre ambos criterios de selección (Figura 19), se observa que cuando se trata sólo con AAS, en el grupo seleccionado bajo el criterio del árbol de decisión el porcentaje que se obtuvo fue del 20% frente a un 13% en el caso del criterio de selección americano. En el subgrupo de pacientes que recibieron el tratamiento con AAS+GGIV bajo el criterio del árbol de decisión, se observó un tasa del recién nacido vivo del 73% frente al 84% que se registró en el mismo supuesto pero con el criterio de selección americano.

Para las pacientes tratadas con la combinación de AAS+HBPM+GGIV el gráfico refleja un ligero aumento de la tasa de RNV en el caso del criterio del árbol de selección (73%) en comparación con el criterio americano (71%).

Si se estudia la tasa de recién nacido vivo teniendo en cuenta sólo la presencia de GGIV en el tratamiento, se obtiene para el caso del criterio americano un 80% y para el criterio de selección basado en el árbol del decisión un 74%.

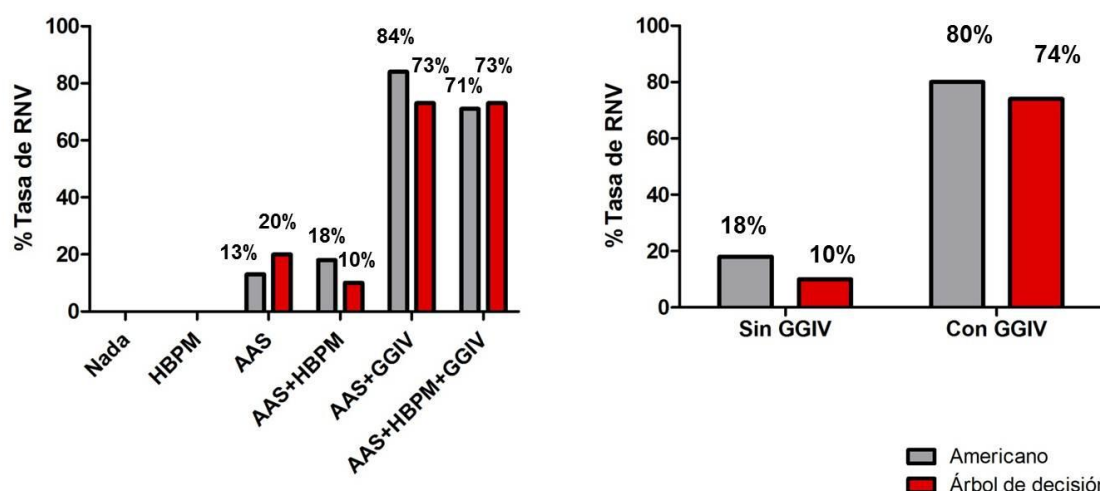


Figura.19. Comparación de la tasa de recién nacido vivo (RNV) según criterio de selección en pacientes pertenecientes al grupo de fallo de implantación recurrente (FIR). HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico).

4.9.6 Comparación de la tasa de recién nacido vivo entre criterio americano y árbol de decisión en pacientes del grupo AR.

Tanto en el subgrupo de AAS+GGIV como en el de AAS+HBPM+GGIV, la tasa de RNV vivo fue ligeramente menor en el supuesto de utilizar los criterios de selección del árbol de decisión. Así, para el tratamiento compuesto por AAS+GGIV se obtiene una tasa de RNV 95% vs 98% y para el tratamiento de AAS+HBPM+GGIV 88% vs 94% correspondiendo en ambos casos el valor más alto al criterio de selección americano (Figura 22).

Si se centra la atención, al igual que hemos hecho en los casos anteriores en analizar la tasa de recién nacido vivo, teniendo como única variable la presencia o no de GGIV en el tratamiento, se observa que la tasa de RNV cuando se usa el criterio americano es del 96% frente a un 91% en el caso del árbol de decisión actual (Figura 20).

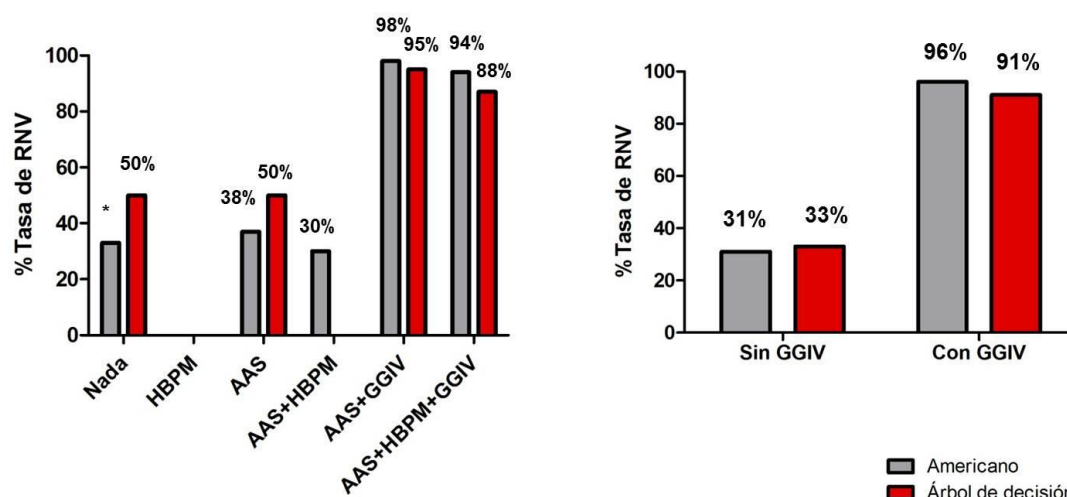


Figura.20. Comparación de la tasa de recién nacido vivo (RNV) según criterio de selección en pacientes pertenecientes al grupo de abortos recurrentes (AR). *33% de tasa de recién nacido vivo según el criterio americano un mujeres que no recibieron tratamiento. HBPM (heparina de bajo peso molecular), AAS (ácido acetilsalicílico).

4.9.7 Distribución de pacientes con AR y FIR en función de la edad y el porcentaje de células NK.

Según lo expuesto anteriormente, el criterio de selección basado en el árbol de decisión propuesto, presentó unas tasas de éxito similares respecto al criterio americano en aquellas pacientes que recibieron tratamiento con GGIV.

Cuando se analizó los porcentajes de células NK en las pacientes de los grupos con AR y FIR según la edad, se observó que dentro del grupo de pacientes con valores de células NK superiores al 18%, existe un subgrupo que presenta unos valores de células NK entre el 22% y 32% (Figura 21). Estas pacientes forman de manera casi exclusiva el grupo seleccionado por el modelo del árbol. Por ello como se representa en la Tabla 24, la tasa de gestación y la tasa de RNV en el grupo de FIR son menores en las pacientes pertenecientes al grupo que presentaron valores de células NK superiores al 22% de linfocitos totales.

Gestación entre todas las mujeres del grupo FIR							RNV entre todas las mujeres del grupo FIR				RNV entre las mujeres embarazadas del grupo AR			
							No	Sí	Total	Tasa de gestación	No	Sí	Total	Tasa de RNV
Criterio Americano														
Sin GGIV							17	4	21	19,0%	19	2	21	9,5%
13%≤NK≤22%							4	0	4	0,0%	4	0	4	0,0%
NK>22%							3	35	38	92,1%	10	28	38	73,7%
Con GGIV							1	6	7	85,7%	2	5	7	71,4%
13%≤NK≤22%							3	35	38	92,1%	10	28	38	73,7%
NK>22%							1	6	7	85,7%	2	5	7	71,4%
Árbol de decisión														
Sin GGIV							11	2	13	15,4%	12	1	13	7,7%
13%≤NK≤22%							3	0	3	0,0%	3	0	3	0,0%
NK>22%							1	18	19	94,7%	5	14	19	73,7%
Con GGIV							1	5	6	83,3%	2	4	6	66,6%
13%≤NK≤22%							1	18	19	94,7%	5	14	19	73,7%
NK>22%							1	5	6	83,3%	2	4	6	66,6%

Tabla. 24. Tasa de gestación en el grupo de mujeres pertenecientes al grupo FIR y tasa de recién nacido vivo (RNV) en el grupo con fallo de implantación recurrente (FIR) y aborto recurrente (AR). Según criterio de selección americano y árbol de selección y en función de la presencia de GGIV en el tratamiento.

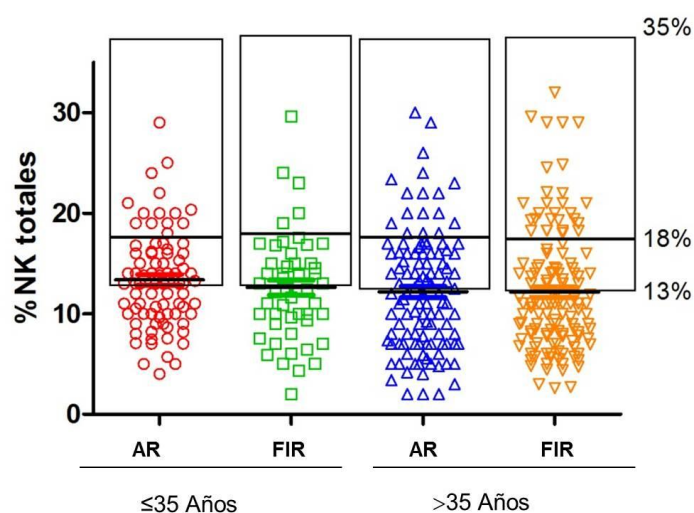


Figura. 21. Porcentaje de células NK totales en pacientes pertenecientes a los grupos con abortos recurrentes (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR) en función de la edad de las pacientes.

4.10 Análisis de regresión logística multivariante.

Se realizó un modelo de regresión logística multivariante para las todas las variables con asociación estadísticamente significativa con la tasa de gestación y la tasa de recién nacido vivo asociada al tratamiento con GGIV. De las diferentes variables estudiadas, AAS, HBPM, edad, porcentaje de células NK totales, GGIV, ovodonación y porcentaje de células NKT-like (estas dos últimas sólo en el grupo de FIR). La única variable que presentó asociación estadísticamente significativa con la tasa de gestación y con la tasa de recién nacido vivo fue la GGIV. Se realizó el análisis de regresión en función de la GGIV (Tabla 25).

Análisis de Regresión logística. Variable independiente GGIV.				
Tasa	Valor-p	O.R	I.C 95%	
Gestación en mujeres grupo FIR	<0,0001	39,722	10,314	152,982
RNV en mujeres grupo FIR	<0,0001	18,400	8,416	40,229
RNV en mujeres grupo AR	<0,0001	59,250	15,538	225,933

Tabla. 25. Resultados de análisis de regresión logística para la tasa de gestación y la tasa de recién nacido vivo (RNV) en el grupo de mujeres con aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y fallo reproductivo recurrente (FRR). Según criterio de selección de células NK>12%. Odds ratio (O.R). Intervalo de confianza al 95% (I.C 95%).

El mismo estudio se realizó sobre la base de datos aplicando el criterio de selección del árbol de decisión y al igual que en el caso anterior, de todas las variables estudiadas la única que presenta asociación estadísticamente significativa es la GGIV (Tabla 26).

Análisis de Regresión logística. Variable independiente GGIV.				
Tasa	Valor-p	O.R	I.C 95%	
Gestación en mujeres grupo FIR	<0,0001	50,000	8,186	305,416
RNV en mujeres grupo FIR	<0,0001	25,714	4,718	140,138
RNV en mujeres grupo AR	0,004	21,333	2,694	168,929

Tabla. 26. Resultados de análisis de regresión logística para la tasa de gestación y la tasa de recién nacido vivo (RNV) en el grupo de mujeres con aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y fallo reproductivo recurrente (FRR) según criterios de selección del modelo de árbol de decisión propuesto en este trabajo. Odds ratio (O.R). Intervalo de confianza al 95% (I.C 95%). *Tasa de RNV en las mujeres embarazadas.

5. DISCUSIÓN

Actualmente la infertilidad constituye un importante problema de Salud Pública. Se considera que alrededor de un 70-80% de las pacientes con FRR de causa no filiada asocian alteraciones inmunológicas, aún no claramente establecidas¹³. Entre la alteraciones inmunológicas descritas en este grupo de pacientes, un aumento en el número o función (actividad citotóxica de las células natural killer (NK) excesiva o una actividad proinflamatoria de los linfocitos T aumentada frente al trofoblasto o embrión) se han implicado con el FRR. En los casos de FRR, una situación de desequilibrio entre las respuestas inmunológicas Th1/Th17/Th2 puede resultar en un predominio de citoquinas Th1/Th17 en el microambiente local de la interfase maternofoetal, lo que puede conllevar a una activación y a un aumento de la proliferación de las células NK periféricas, que podría favorecer una migración de éstas hacia el útero, contribuyendo en último término a favorecer una situación inflamatoria local que podría desencadenar el fallo gestacional⁸³. El primer paso para prevenir las pérdidas fetales, es definir de forma rigurosa los factores fisiopatológicos implicados y biomarcadores que permitan definir un subgrupo de pacientes que podrían beneficiarse de una terapia inmunomoduladora como las gammaglobulinas intravenosas (GGIV)

¿Qué función desempeñan las células NK en el embarazo? Diferentes estudios demuestran que las células NK están implicadas en diversos procesos esenciales para la implantación y el embarazo, tales como la inmunovigilancia, angiogénesis, remodelación de las arterias espirales a arterias uteroplacentarias, sustentar las propiedades del trofoblasto y el crecimiento de la placenta, vascularización de la decidua y producción de moléculas inmunomoduladoras que median la tolerancia materna. En las pacientes con FRR, diferentes funciones patológicas asociadas a las células NK han sido descritas, como son: actividad citotóxica, inhibición de la secreción de hGC por parte de la placenta, activación del complemento, desequilibrio de citoquinas Th1/Th17/Th2, fallo en la activación de la respuesta Th2 y activación de las CPA que inducen el predominio de una respuesta Th1/Th17. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se desencadena la pérdida fetal es todavía desconocido.

En relación con lo descrito anteriormente se plantea la siguiente pregunta: ¿Son las células NK periféricas un buen biomarcador para predecir fallo reproductivo ulterior en mujeres diagnosticadas de FRR? Las células NK han sido recientemente identificadas como un factor inmunológico relevante en el campo reproductivo. Dentro de las NK periféricas se distinguen dos tipos de subpoblaciones: las células CD56⁺CD16⁺, las

cuales representan aproximadamente el 90-95% del total de las células NK y las células CD56^{bright}CD16⁻, que representan alrededor del 5% de los linfocitos presentes en sangre periférica.

Las células NK endometriales no han sido bien caracterizadas a nivel fenotípico. Están presentes ya en el endometrio no grávido durante el ciclo menstrual. Sin embargo, las células NK deciduales han sido extensamente estudiadas. Aproximadamente el 70% de los linfocitos deciduales son células NK de fenotipo CD56^{bright}CD16⁻⁸⁷. El origen de las dNK CD56^{bright} es todavía desconocido, pero presentan unas características similares a la subpoblación de células NK CD56^{bright} de sangre periférica. Una hipótesis postula que las células NK de la sangre periférica migran hacia el útero, donde, en presencia de un ambiente hormonalmente enriquecido, proliferan, se diferencian, aumentan de tamaño y adquieren gránulos citoplasmáticos¹⁰⁹. Los procesos de implantación y placentación están estrechamente relacionados entre sí e implican el contacto directo de las células y tejidos fetales y los maternos. La presencia de sangre materna en el espacio intervilosario de la placenta al final del primer trimestre, permite el contacto físico directo entre las células inmunológicas maternas circulantes y el sincitiotrofoblasto placentario¹⁹⁵. Así, las células NK de sangre periférica circulantes alrededor del sitio de implantación, están en contacto directo con las células del trofoblasto¹⁹⁶, lo que explicaría el efecto de las células NK circulantes sobre la implantación y la gestación, independientemente de las dNK y eNK. Asimismo, Park et al, pusieron de manifiesto que el número de células NK CD56⁺ en tejidos deciduales se correlacionaban significativamente con el número de células NK CD56⁺CD16⁺ en sangre periférica. Esto sugiere que las células NK periféricas podrían reflejar los cambios de las células deciduales¹⁹⁷. Por consiguiente, si las células NK periféricas y en concreto la subpoblación CD56⁺CD16⁺, pueden reflejar los cambios en las células deciduales, esta subpoblación podría ser utilizada como biomarcador predictivo de FRR, tanto en los casos de AR como en los de FIR.

Estudios previos habían descrito la asociación entre células NK y FRR^{109, 196-198}. En la presente memoria, se pone de manifiesto por primera vez que las células NK son un factor de riesgo independiente para FRR. Se propone como mejor punto de corte para discriminar mujeres con un diagnóstico de FRR, un valor para las células NK >18% de los linfocitos totales. Durante los últimos años se han propuesto diferentes puntos de corte para esta variable. En 1995, Coulam et al. establecieron un porcentaje >12% para

las células NK periféricas en relación con el FRR^{16, 199, 200}. En ninguno de estos trabajos se explica mediante qué método estadístico se determinó dicho valor. Más tarde, en 2003, Yamada et al. establecieron en una cohorte de 117 pacientes un porcentaje de 16,4% de NK periféricas como un valor óptimo para poder discriminar entre aborto y recién nacido vivo; este valor fue obtenido mediante la utilización de curvas ROC¹⁷. En 2007, Perricone et al. proponen como punto de corte para esta variable un valor >15%, definido con la media+2 desviación estándar y calculado a partir de 200 controles sanos y sin población de riesgo. Según Perricone, este valor señala el punto de corte a partir del cual se ve aumentado el riesgo de aborto recurrente^{197, 201, 202}.

En este trabajo se ha determinado un valor del 18% de células NK totales como el mejor marcador para definir el riesgo de fallo reproductivo en la población española, mediante curvas ROC en una población de pacientes con FRR (n=428) y 50 controles sanos²⁰³ (en prensa). Este biomarcador permitiría definir un grupo de mujeres con FRR de probable causa inmunológica y por tanto que podrían beneficiarse de una profilaxis de pérdida gestacional con un fármaco inmunomodulador para prevenir la pérdida gestacional en una siguiente gestación.

La mayoría de estudios que se encuentran en la literatura científica se centran principalmente en el la población total de células NK. Sin embargo, las subpoblaciones de células NK y especialmente la subpoblación CD56⁺CD16⁺ NK o citotóxicas podría ser utilizada como biomarcador subrogado de FRR. Mediante curvas ROC se ha definido el valor para la subpoblación CD56⁺CD16⁺ del 13% de linfocitos totales, a partir del cual se pueden definir un subgrupo de pacientes con alto riesgo de futuras pérdidas embrionarias/fetales. Nuestros resultados corroboran lo descrito por Lu, que considera que debido a su actividad citotóxica, la subpoblación CD56⁺CD16⁺ correspondería al mejor biomarcador para diagnosticar FRR¹⁹⁸. Un dato relevante es que las células CD56⁺CD16⁺ en las mujeres con FRR representan un 84% de los linfocitos frente a un 55,6% en las mujeres sanas.

Durante las pasadas dos décadas, los especialistas en esta patología han evaluado y tratado a mujeres con FRR de acuerdo con diferentes pruebas diagnósticas con el fin de establecer una posible causa y un tratamiento adecuado. Entre las distintas pruebas inmunológicas se encuentran el test para anticuerpos antinucleares, anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos anti-tiroideos, descarte de enfermedad celiaca, estudio de

trombofilias congénitas. Actualmente, el estudio se ha ampliado para descartar causa aloinmune, mediante la determinación de los receptores KIR y ligandos HLA-C de la pareja, recuento de células NK/NKT-like, ensayos de citotoxicidad y el estudio de la proporción entre las citoquinas Th1:Th2²⁰⁴. En este contexto, el presente estudio aporta un algoritmo multivariante diagnóstico que permite definir los factores de riesgo de fallo gestacional y diseñar un modelo de árbol de decisión de utilidad en la práctica clínica habitual.

Según este algoritmo diagnóstico en mujeres con FRR, nuestro modelo propone para mujeres menores de 35 años, un gradiente de riesgo con un intervalo entre el 13% y el 24% de células NK. Sin embargo, para mujeres mayores de 35 años el modelo se vuelve más restrictivo dando sólo la opción de “sí” o “no”, lo que consideramos más práctico desde el punto de vista de toma de decisiones clínicas. Así, nuestro modelo propone que mujeres menores de 35 años que tengan un porcentaje de células NK igual o superior al 24% y un porcentaje de células CD56⁺CD16⁺>22% y las mujeres mayores de 35 años con un valor de células NK superior al 18% y un porcentaje de CD56⁺CD16⁺>13% son definidas como los grupos de mayor riesgo (100%) de fallo gestacional subsiguiente. Ambos grupos presentarían una alteración inmunológica asociada al FRR, constituyendo un subgrupo de pacientes candidatas a terapia inmunomoduladora.

Desde el punto de vista inmunológico, las diversas alteraciones inmunológicas asociadas son superponibles, sin existir diferencias significativas entre los grupos con AR y FIR, por lo que se seleccionó como mejor árbol de decisión aquel que trata a todas las mujeres con FRR en su conjunto, con mayor potencia inmunomoduladora.

El fallo reproductivo recurrente puede ser considerado como una entidad clínica multifactorial, ya que puede haber muchos factores implicados en su fisiopatología. Por ello, en la presente memoria, se ha llevado acabo el análisis de diferentes variables clínicas e inmunohematológicas, de las cuales se conoce su implicación en el fallo reproductivo, junto con nuestra variable central: las células NK.

En relación con el análisis descriptivo de la población de estudio, un elemento de extraordinario interés por su relación con la disfunción ovulatoria es el metabolismo tiroideo. Sus efectos sobre la función reproductiva pueden ejercerse al menos por tres vías: 1) a través de las distorsiones que provoca en la masa corporal, 2) por interferencia directa de la hormona estimulante del tiroides (TSH) con el eje hipotálamo-hipofiso-

gonadal (y por tanto en la maduración folicular) y finalmente, 3) por su vital influencia en la función trofoblástica²⁰⁵.

Los trastornos del tiroides son consecuencia fundamentalmente de procesos autoinmunes que estimulan la producción excesiva de hormonas tiroideas por anticuerpos estimulantes del receptor de la TSH (hipertiroidismo o enfermedad de Graves) o provocan destrucción de la glándula y producción insuficiente de hormonas tiroideas (hipotiroidismo, enfermedad de Hashimoto). Las enfermedades autoinmunes de la glándula tiroides son muy frecuentes entre las mujeres en edad reproductiva²⁰⁵.

En nuestra población de estudio en el grupo con FRR como se describió en el apartado de resultados un 32,45% presentaron valores altos de TSH (superiores a 2,5μU/ml). En un estudio exhaustivo de la disfunción tiroidea se analizó cuántas de estas mujeres presentaban además positividad para los anticuerpos anti-tiroideos. Un 3,85% (n=13) de las mujeres con FRR, TSH alta fueron positivas para anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea. Mientras que en el caso del anticuerpo anti-tiroglobulina, un 3,02% (n=10) se registraron con títulos altos. El hallazgo de estos resultados pone de manifiesto la existencia de una población de mujeres, que presentan una disfunción tiroidea, lo que puede contribuir al mal pronóstico de la gestación. Mujeres embarazadas con alteraciones del tiroides presentan mayor riesgo de pérdida gestacional²⁰⁶. De lo anteriormente expuesto es necesario plantear la necesidad de realizar un cribado para la enfermedad tiroidea durante el embarazo, particularmente para el hipotiroidismo, en pacientes con FRR. En el año 2006 se consensuó por las asociaciones de Endocrinología el tratamiento con hormona tiroidea (tiroxina) para ajustar los niveles de TSH antes y durante la gestación²⁰⁷.

El embarazo es un estado protrombótico en el cual se producen cambios en el sistema hemostático con el objetivo de prevenir una posible hemorragia durante la implantación, la placentación y el parto. Diversas alteraciones trombofílicas, congénitas o adquiridas, se han relacionado con complicaciones obstétricas, que se explicarían por la aparición de trombosis micro/macrovasculares, uteroplacentarias, con la consecuente insuficiencia vascular placentaria e hipoperfusión embrionaria y/o fetal^{208, 209}.

Entre las trombofilias congénitas, los polimorfismos más relevantes son la variante heterocigota del factor V de Leiden, seguida de la protrombina anómala (G20210A) (factor II) y la variante termolábil C667T de la MTHFR. Todas ellas, además de

aumentar el riesgo tromboembólico, se han relacionado con antecedentes obstétricos de AR/FIR²¹⁰.

En nuestra población de mujeres pertenecientes al grupo con FRR (n=428) un 55,79% (n=178), presentaron mutación de tipo heterocigota para MTHFR. Frente a un 10,34% (n=33) de pacientes que fueron diagnosticadas con mutación de tipo homocigota para MTHFR. En el caso del factor V un 3,85% (n=12) fueron portadoras de mutación heterocigota. De forma similar al factor V, un 3,22% (n=10) de pacientes pertenecientes al grupo FRR presentaron mutación heterocigota para el gen que codifica el factor II. En un único caso se registró la presencia de mutación en los tres genes a la vez.

Por otra parte, en el campo de las trombofilias adquiridas, nos encontramos con el síndrome antifosfolípido, que es una causa reconocida de trombosis y complicaciones obstétricas (AR, FIR, crecimiento intrauterino retardado, pre-eclampsia, eclampsia, rotura prematura de membranas, entre otras)^{211, 212}. Como hemos comentado anteriormente en el apartado de resultados, un total de 36 mujeres (9,30%) incluidas en el grupo FRR presentaron anticuerpos anti-cardiolipina. El 7,96% (n=16) fueron positivas para anticuerpos anti-cardiolipina a la vez que presentaron expansión de células NK. En el caso de los anticuerpos anti-β2-glicoproteína I, un total de 18 mujeres (4,78%) pertenecientes al grupo FRR presentaron anticuerpos anti-β2-glicoproteína I. El 4,74 % (n=9) presentaron de manera simultánea expansión de células NK y anticuerpos anti-β2-glicoproteína I.

Un 41% (n=175) de las pacientes estudiadas fueron diagnosticadas con expansión de células NK como única alteración inmunológica.

Un total de 157 mujeres incluidas en el grupo con FRR con expansión de células NK o NKT-like, fueron sometidas a tratamiento con GGIV. En un grupo de 86 pacientes, se evaluó la evolución del porcentaje de células NK circulantes a lo largo de la gestación, las mediciones como se explica en el apartado de resultados se realizaron en cuatro momentos, basal, y en cada uno de los trimestres del embarazo. Nuestros resultados reflejan claramente un descenso significativo en el porcentaje de las células NK a lo largo de la gestación, encontrando diferencias significativas entre el basal y cada uno de los trimestres del embarazo, corroborando así el efecto inmunomodulador específico de la GGIV sobre la población de células NK. En 1996, Ruiz et al, pusieron de manifiesto mediante experimentos *in vitro* que la GGIV disminuye la actividad citotóxica de las

células NK, la porción de la molécula de IgG responsable de la inhibición es la de unión al antígeno¹³⁵. Por otra parte, Shimada et al, determinaron que concentraciones altas de GGIV aumentan la expresión del receptor inhibitorio CD94 y como consecuencia de este efecto se suprime la actividad citotóxica de las células NK²¹³.

Se han utilizado diversas terapias inmunomoduladoras en estas pacientes con FRR y expansión de células NK/NKT-like con diferente base teórica y evidencia clínica¹³⁴, encaminada a suprimir la actividad inmunológica endometrial excesiva. Se ha demostrado que las GGIV no aportan beneficio en mujeres con FRR consideradas globalmente^{6, 214-217}. Sin embargo, diversos estudios apoyan que este tratamiento es beneficioso en un grupo de mujeres con FRR de causa inmunológica, en relación con la expansión de células NK y NKT-like en sangre periférica^{12, 135, 202, 213, 218-221}. En nuestro grupo, hemos demostrado que en pacientes con FRR (n=40) asociado con expansión de células NK la tasa de recién nacido vivo fue de un 95% para los casos de AR (n=20) y de un 75% para el grupo de pacientes e FIR (n=20)¹³³. Estos resultados ponen de manifiesto, la dificultad de clasificar correctamente a la población de estudio y la necesidad de definir con exactitud el grupo de pacientes que se beneficiaran del tratamiento con GGIV. Una variable a tener en cuenta en la diferencia de resultados obtenidos según el estudio, es la dosis de GGIV y duración del tratamiento. Los resultados presentados en la presente memoria demuestran que en aquellas pacientes con FRR asociado con expansión de células NK/NKT-like, el tratamiento con GGIV aumenta de manera significativa en la tasa de gestación y de recién nacido vivo. El concepto FRR engloba dos entidades, AR y FIR. Estos dos grupos aparentemente distintos podrían compartir mecanismos fisiopatológicos, al menos en un subgrupo de pacientes con alteraciones inmunológicas.

Así, cuando se analiza la tasa de recién nacido vivo en ambos grupos por separado, se observa que en el grupo con AR la tasa RNV en las pacientes con GGIV es de un 96,3% frente a un 30,8% en aquellas a los que no se les ha suministrado GGIV. En las series más amplias publicadas en la literatura científica la tasa de RNV mujeres con AR y sin tratamiento con GGIV fue del 49,7%⁶. Sin embargo, en el grupo de FIR en las pacientes a las que se administró GGIV, la tasa de RNV es del 80% si se compara con aquellas que no recibieron GGIV en su tratamiento (17,9%), aun así, la tasa de RNV que se obtuvo en el grupo de mujeres con FIR que no se les administró GGIV se encuentra dentro del rango recogida en la literatura médica que es del 5,1-22%^{221, 222} mediante

análisis multivariante e regresión logística y considerando las variables AAS, HBPM, edad, porcentaje de células NK totales, GGIV, ovodonación y porcentaje de células NKT-like (estas dos últimas sólo en el grupo de FIR). La tasa de RNV resultó ser significativamente mayor en aquellas mujeres a las que se les administró GGIV. Estos resultados dejan claro que cuando se selecciona a las pacientes en función de la alteración inmunológica como es la expansión de células NK/NKT-like, el efecto clínico del tratamiento con GGIV en relación a la tasa de recién nacido vivo es superior a los datos manejados en la literatura científica que se encuentran en un rango entre 45% y el 58% en FIR^{218, 221}.

Sólo en el grupo de FIR se pudo valorar la tasa de gestación, ya que en este grupo el inicio del tratamiento se hizo 24h antes de la transferencia del embrión. De este modo, en aquellas pacientes a las que se les administró GGIV la tasa de gestación fue del 93,8% frente a un 26,2% en el grupo que no recibió GGIV. En el estudio realizado por Winger et al se obtuvo una tasa de gestación del 61%²²¹ sobre un total de 62 pacientes con FIR a las que se les administró GGIV, en el caso del grupo de pacientes con FIR que no recibieron tratamiento con GGIV la tasa de gestación que obtuvieron fue del 26%²²¹, siendo este valor igual al obtenido en el presente estudio. Así, en el grupo de FIR la administración de GGIV es crucial en las primeras etapas de la gestación, puesto que es donde se reflejan las mayores diferencias entre los subgrupos que han recibido GGIV y los que no. Dentro de este subgrupo, se distinguió entre aquellas pacientes que recibieron ovodonación y las que no. Las tasas de éxito gestacional varían en función de la edad de la madre, y el tipo de embriones utilizados en la transferencia, (embriones frescos, crio-trasferencia u ovodonación). Las mayores tasas de éxito gestacional obtenidas según la Sociedad Española de Fertilidad, se han conseguido tras ciclos con ovodonación, con porcentajes superiores al 45% en todos los grupos de edad². En nuestro caso en concreto, sí se observan diferencias en la tasa de gestación y de RNV entre los grupos sin ovodonación y con ovodonación en ausencia de GGIV. Sin embargo, cuando se las trata con GGIV esas diferencias desaparecen y presentan porcentajes muy similares entre ambos grupos. Hay que señalar que los datos de la SEF se refieren al total de mujeres sometidas a técnicas de fecundación *in vitro* y que en nuestro caso se refiere a mujeres diagnosticadas como FIR de causa inmunológica (expansión de células NK y NKT-like), y que fueron tratadas con GGIV. El hecho de que se haya estudiado un subgrupo de pacientes dentro de la totalidad de mujeres

incluidas en el grupo de FIR, podría explicar que los porcentajes obtenidos sean mucho mayores.

Las pacientes recibieron diferentes tratamientos, basados en la combinación de ácido acetilsalicílico (AAS) (anti-agregante plaquetario), heparina de bajo peso molecular (HBPM) y GGIV, independientemente del grupo que estudiemos (AR o FIR). En todos los casos en los que se suministró HBPM junto con AAS+GGIV, la tasa de gestación y recién nacido vivo fueron discretamente inferiores a las obtenidas en aquellas mujeres cuyo tratamiento fue AAS+GGIV. Ante estos resultados podemos plantear la hipótesis, de que el grupo al que se le ha suministrado los tres fármacos presentan una fisiopatología más compleja y por tanto de peor pronóstico que las otras mujeres a las cuales se les ha proporcionado otro tratamiento.

Como se comentó en el apartado de resultados, las pacientes fueron seleccionadas según el criterio americano (expansión de células NK >12% de linfocitos totales). Con el fin de evaluar el árbol de decisión propuesto, quisimos analizar qué efecto clínico tendría el tratamiento con GGIV si las pacientes hubieran sido clasificadas según los nuevos criterios. Como se describe en el apartado de resultados, los porcentajes obtenidos son similares que en el caso del criterio americano, siendo incluso superiores en el caso del FIR. Sin embargo, las diferencias respecto al grupo de no tratadas siguen siendo significativas. A simple vista, cabría esperar que las tasas de gestación y de RNV obtenidas fuesen mayores siguiendo el árbol de decisión establecido, ya que se están seleccionando mejor a las pacientes que deberían recibir el tratamiento. Sin embargo, encontramos que este grupo de pacientes presentan unos valores de células NK por encima del 18%, lo que las convierte en un grupo en el cual conseguir la inmunomodulación de esta población es más complicado, pudiendo plantearse un ajuste de la dosis en estos casos.

A la vista de los resultados obtenidos y con las limitaciones que supone un estudio observacional retrospectivo pero con un elevado número de pacientes, se puede afirmar que el tratamiento con GGIV tiene un efecto clínico claramente beneficioso sobre la tasa de gestación y sobre la tasa de recién nacido vivo en mujeres con FRR de causa inmunológica. En el análisis de regresión logística multivariante, los odds ratio, representan el efecto protector de la GGIV. Los valores obtenidos se encuentran en unos rangos muy elevados en comparación con lo registrado en la literatura médica⁶. La

diferencia de resultados obtenidos puede ser debida como comentamos anteriormente a los criterios de selección de las pacientes, la dosis y la duración del tratamiento. En este estudio para seleccionar a las pacientes nos ceñimos a las definiciones aprobadas por consenso para cada grupo (AR y FIR) y que se recogen en la introducción de esta memoria.

Los efectos inmunomoduladores de la GGIV son complejos y afectan a la práctica totalidad de las células del sistema inmunológico. En particular, se ha descrito la supresión de la actividad citotóxica de las células NK, el efecto sobre el número de células NK y la expansión de las células T reguladoras, de Groot et al, observaron que las moléculas de IgG contienen regiones o epítomos llamados “Treg-itopos” en la región Fc, que son capaces de activar linfocitos T reguladores¹⁵⁸.

Desde hace más de 25 años, la utilización del tratamiento con GGIV en la gestación a dosis bajas (200-400 mg/kg de peso/3-4 semanas) es una terapia de sustitución de primera línea en pacientes con inmunodeficiencias primarias, en las que las inmunoglobulinas o anticuerpos suponen la protección necesaria frente a las infecciones para la madre y el feto, existiendo una larga experiencia en su utilización con muy buen perfil de seguridad durante la gestación en pacientes con inmunodeficiencias primarias²²³⁻²²⁵. Según el protocolo utilizado en FRR, la GGIV se utiliza a dosis bajas demostrando un efecto inmunomodulador.

El tratamiento con GGIV a dosis altas (1-2g/kg de peso/mes) se ha considerado también como una terapia segura y eficaz durante el embarazo para disminuir las dosis de otros inmunosupresores o cuando otras terapias convencionales no han sido eficaces para el control de la inflamación durante el embarazo en numerosas enfermedades de base autoinmune, como la trombocitopenia inmunológica (primera línea de tratamiento), esclerosis múltiple (primera línea de tratamiento), lupus, miastenia gravis, y otras enfermedades autoinmunes²²⁶⁻²²⁸.

Los resultados obtenidos en este estudio observacional retrospectivo servirán de base para el diseño de un ensayo clínico, que permita analizar la eficacia clínica de la gammaglobulina en esta patología.

6. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de células natural killer circulantes es un factor de riesgo independiente de fallo reproductivo recurrente.
2. La subpoblación CD56⁺/CD16⁺ constituye el mejor marcador subrogado en pacientes con fallo reproductivo mayores de >35 años.
3. La edad materna y el porcentaje de células natural killer y CD56⁺/CD16⁺ permiten definir un grupo de mujeres con fallo reproductivo recurrente con elevado riesgo de pérdida gestacional que pueden beneficiarse de inmunomodulación con gammaglobulinas circulantes.
4. Un porcentaje de células NKT-like circulantes superior al 10% de los linfocitos totales se asocia a fallo reproductivo recurrente.
5. El tratamiento con GGIV disminuye el porcentaje de células natural killer circulantes durante la gestación en mujeres con fallo reproductivo recurrente.
6. En este estudio observacional retrospectivo, el tratamiento con GGIV induce un efecto clínico beneficioso sobre la tasa de gestación en mujeres con fallo de implantación recurrente y expansión de células natural killer.
7. En mujeres con fallo de implantación recurrente, las diferencias observadas en las tasas de gestación y recién nacido vivo entre los grupos que utilizaron ovodonación o sus propios ovocitos desaparecen cuando se les suministra el tratamiento con GGIV, obteniéndose en ambos casos tasas superiores al 70%.
8. En este estudio observacional retrospectivo el tratamiento con GGIV aumentó la tasa de recién nacido vivo en mujeres con fallo reproductivo recurrente, tanto en mujeres con abortos recurrentes como en fallo de implantación recurrente.
9. Mediante análisis de regresión logística multivariante considerando la edad, células natural killer circulantes y tratamiento administrado (GGIV, AAS, HBPM), la GGIV demuestra un efecto beneficios independiente sobre las tasas de gestación y de recién nacido vivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Zegers-Hochschild, F. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and sterility* **92**, 1520-1524 (2009).
2. *Libro blanco sociosanitario: La Infertilidad en España situación actual y perspectivas.* (Madrid; 2011).
3. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A. & Nygren, K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* **22**, 1506-1512 (2007).
4. Regan, L. & Rai, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Bailliere's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **14**, 839-854 (2000).
5. Lee, R.M. & Silver, R.M. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Seminars in reproductive medicine* **18**, 433-440 (2000).
6. Ata, B., Tan, S.L., Shehata, F., Holzer, H. & Buckett, W. A systematic review of intravenous immunoglobulin for treatment of unexplained recurrent miscarriage. *Fertility and sterility* **95**, 1080-1085 e1081-1082 (2011).
7. Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M. & Eldar-Geva, T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* **21**, 3036-3043 (2006).
8. El-Toukhy, T. & Taranissi, M. Towards better quality research in recurrent implantation failure: standardizing its definition is the first step. *Reproductive biomedicine online* **12**, 383-385 (2006).
9. Nybo Andersen, A.M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J. & Melbye, M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* **320**, 1708-1712 (2000).
10. Rai, R. & Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet* **368**, 601-611 (2006).
11. de la Rochebrochard, E. & Thonneau, P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* **17**, 1649-1656 (2002).
12. Kwak-Kim, J., Yang, K.M. & Gilman-Sachs, A. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. *The journal of obstetrics and gynaecology research* **35**, 609-622 (2009).
13. Karami, N., Boroujerdnia, M.G., Nikbakht, R. & Khodadadi, A. Enhancement of peripheral blood CD56(dim) cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or in vitro fertilization failure. *J Reprod Immunol* **95**, 87-92 (2012).
14. Ford, H.B. & Schust, D.J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* **2**, 76-83 (2009).
15. Chen, X.Y., Zhuang, Y.L., Li, L., Zhang, W.W. & Huang, L.L. The effect of mifepristone on the peripheral blood natural killer cell's cytotoxicity and expression of CD94/NKG2A and NKG2D during the implantation phase. *Fertility and sterility* **93**, 2615-2620 (2010).
16. Beer, A.E., Kwak, J.Y. & Ruiz, J.E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* **35**, 376-382 (1996).
17. Yamada, H. *et al.* Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* **50**, 351-354 (2003).
18. Fukui, A. *et al.* Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol* **90**, 105-110 (2011).
19. Shakhar, K. *et al.* High NK cell activity in recurrent miscarriage: what are we really measuring? *Hum Reprod* **21**, 2421-2425 (2006).
20. Vujisic, S. *et al.* B- and T-cells in the follicular fluid and peripheral blood of patients undergoing IVF/ET procedures. *Am J Reprod Immunol* **52**, 379-385 (2004).

21. Ledee-Bataille, N. *et al.* Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertility and sterility* **83**, 598-605 (2005).
22. Matteo, M.G. *et al.* Normal percentage of CD56bright natural killer cells in young patients with a history of repeated unexplained implantation failure after in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility* **88**, 990-993 (2007).
23. Tang, A.W., Alfirevic, Z. & Quenby, S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod* **26**, 1971-1980 (2011).
24. Wilcox, A.J., Baird, D.D. & Weinberg, C.R. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* **340**, 1796-1799 (1999).
25. Johnson, M.H., Everitt, B.J. (Oxford, Blackwell Pub, 2007).
26. Dey, S.K. *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews* **25**, 341-373 (2004).
27. Huppertz, B. & Hunt, J.S. Trophoblast apoptosis and placental development--a workshop report. *Placenta* **21 Suppl A**, S74-76 (2000).
28. Renaud, S.J. & Graham, C.H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunological investigations* **37**, 535-564 (2008).
29. Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B. & King, R.G. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research* **114**, 397-407 (2004).
30. Sargent, I.L., Borzychowski, A.M. & Redman, C.W. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends in immunology* **27**, 399-404 (2006).
31. Hammer, A. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* **90**, 21-28 (2011).
32. Chazara, O., Xiong, S. & Moffett, A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *Journal of leukocyte biology* **90**, 703-716 (2011).
33. Hiby, S.E. *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* **120**, 4102-4110 (2010).
34. Warning, J.C., McCracken, S.A. & Morris, J.M. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* **141**, 715-724 (2011).
35. Hviid, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* **12**, 209-232 (2006).
36. Frumento, G. *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of experimental medicine* **196**, 459-468 (2002).
37. Sasaki, Y. *et al.* Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* **10**, 347-353 (2004).
38. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* **3**, 1097-1101 (2002).
39. Munn, D.H., Sharma, M.D. & Mellor, A.L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* **172**, 4100-4110 (2004).
40. Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. & Betz, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* **5**, 266-271 (2004).
41. Lo, Y.M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**, 485-487 (1997).
42. Bianchi, D.W., Zickwolf, G.K., Weil, G.J., Sylvester, S. & DeMaria, M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 705-708 (1996).

43. Srivatsa, B. *et al.* Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet* **358**, 2034-2038 (2001).
44. Wekerle, T. & Sykes, M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annual review of medicine* **52**, 353-370 (2001).
45. Adams Waldorf, K.M. *et al.* Dynamic changes in fetal microchimerism in maternal peripheral blood mononuclear cells, CD4+ and CD8+ cells in normal pregnancy. *Placenta* **31**, 589-594 (2010).
46. Tafuri, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G.J. & Arnold, B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* **270**, 630-633 (1995).
47. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1213-1222 (2000).
48. Mahnke, K., Knop, J. & Enk, A.H. Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. *Trends in immunology* **24**, 646-651 (2003).
49. Meeusen, E.N., Bischof, R.J. & Lee, C.S. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am J Reprod Immunol* **46**, 169-179 (2001).
50. Mincheva-Nilsson, L., Hammarstrom, S. & Hammarstrom, M.L. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of gamma delta+ cells and show selective down-regulation of alloreactivity. *J Immunol* **149**, 2203-2211 (1992).
51. Chen, Z.W. Comparative biology of gamma delta T cells. *Science progress* **85**, 347-358 (2002).
52. Groh, V. *et al.* Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6879-6884 (1999).
53. Born, W. *et al.* Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Advances in immunology* **71**, 77-144 (1999).
54. Szekeres-Bartho, J., Barakonyi, A., Miko, E., Polgar, B. & Palkovics, T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Seminars in immunology* **13**, 229-233 (2001).
55. Szekeres-Bartho, J. *et al.* The role of gamma/delta T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: a review. *Am J Reprod Immunol* **42**, 44-48 (1999).
56. Mincheva-Nilsson, L. *et al.* gammadelta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for cytotoxic potency. *International immunology* **12**, 585-596 (2000).
57. Groux, H. An overview of regulatory T cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**, 883-889 (2001).
58. Nagaeva, O., Jonsson, L. & Mincheva-Nilsson, L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol* **48**, 9-17 (2002).
59. Mincheva-Nilsson, L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **1**, 120 (2003).
60. Sanchez-Ramon, S. *et al.* Pregnancy-induced expansion of regulatory T-lymphocytes may mediate protection to multiple sclerosis activity. *Immunology letters* **96**, 195-201 (2005).
61. Mold, J.E. *et al.* Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **322**, 1562-1565 (2008).
62. Williams, Z. Inducing tolerance to pregnancy. *N Engl J Med* **367**, 1159-1161 (2012).
63. Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H. & Fainboim, L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* **178**, 2572-2578 (2007).

64. Leber, A. *et al.* Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses. *Methods Mol Biol* **677**, 397-417 (2011).
65. Bulmer, J.N., Williams, P.J. & Lash, G.E. Immune cells in the placental bed. *The International journal of developmental biology* **54**, 281-294 (2010).
66. Burlingham, W.J. A lesson in tolerance--maternal instruction to fetal cells. *N Engl J Med* **360**, 1355-1357 (2009).
67. Yang, H. *et al.* Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertility and sterility* **89**, 656-661 (2008).
68. Tilburgs, T. *et al.* Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* **27 Suppl A**, S47-53 (2006).
69. Fallarino, F. *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation* **9**, 1069-1077 (2002).
70. Steinborn, A. *et al.* Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol* **129**, 401-412 (2008).
71. Solier, C. *et al.* Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *European journal of immunology* **32**, 3576-3586 (2002).
72. Halonen, M. *et al.* Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol* **182**, 3285-3293 (2009).
73. Kwak-Kim, J., Lee, S.K. & Gilman-Sachs, A. Elevated Th1/Th2 cell ratios in a pregnant woman with a history of RSA, secondary Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis complicated with one fetal demise of twin pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **58**, 325-329 (2007).
74. Jin, L.P., Chen, Q.Y., Zhang, T., Guo, P.F. & Li, D.J. The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin Immunol* **133**, 402-410 (2009).
75. Nakashima, A. *et al.* Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **63**, 104-109 (2010).
76. Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L. & Annunziato, F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular immunology* **47**, 3-7 (2009).
77. Taylor, H.S., Vanden Heuvel, G.B. & Igarashi, P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biology of reproduction* **57**, 1338-1345 (1997).
78. Harrington, L.E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**, 1123-1132 (2005).
79. Wang, W.J. *et al.* Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol* **84**, 164-170 (2010).
80. Reid, S.D., Penna, G. & Adorini, L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current opinion in immunology* **12**, 114-121 (2000).
81. Szekeres-Bartho, J. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* **1**, 873-882 (2009).
82. Ait-Azzouzene, D. *et al.* Maternal B lymphocytes specific for paternal histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *J Immunol* **161**, 2677-2683 (1998).
83. Perricone, R., Perricone, C., De Carolis, C. & Shoenfeld, Y. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev* **7**, 384-390 (2008).
84. De Carolis, C., Perricone, C. & Perricone, R. NK cells, autoantibodies, and immunologic infertility: a complex interplay. *Clin Rev Allergy Immunol* **39**, 166-175 (2010).

85. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* **22**, 633-640 (2001).
86. Manaster, I. *et al.* Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* **181**, 1869-1876 (2008).
87. Yagel, S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *Am J Obstet Gynecol* **201**, 344-350 (2009).
88. Grzywacz, B., Kataria, N., Blazar, B.R., Miller, J.S. & Verneris, M.R. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* **117**, 3548-3558 (2011).
89. Lanier, L.L. NK cell receptors. *Annual review of immunology* **16**, 359-393 (1998).
90. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K. & Kershaw, M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* **89**, 216-224 (2011).
91. Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of Nkp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1505-1516 (1999).
92. Pessino, A. *et al.* Molecular cloning of Nkp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* **188**, 953-960 (1998).
93. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology today* **21**, 228-234 (2000).
94. Vitale, M. *et al.* Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine* **187**, 2065-2072 (1998).
95. Bulmer, J.N. & Lash, G.E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Molecular immunology* **42**, 511-521 (2005).
96. Kitaya, K., Yamaguchi, T., Yasuo, T., Okubo, T. & Honjo, H. Post-ovulatory rise of endometrial CD16(-) natural killer cells: in situ proliferation of residual cells or selective recruitment from circulating peripheral blood? *J Reprod Immunol* **76**, 45-53 (2007).
97. Loke, Y.W. & King, A. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Molecular medicine today* **3**, 153-159 (1997).
98. Fukui, A. *et al.* Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* **41**, 413-422 (1999).
99. Lachapelle, M.H., Miron, P., Hemmings, R. & Roy, D.C. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* **156**, 4027-4034 (1996).
100. Quenby, S., Kalumbi, C., Bates, M., Farquharson, R. & Vince, G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility* **84**, 980-984 (2005).
101. Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A. & Mingari, M.C. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends in immunology* **32**, 517-523 (2011).
102. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature reviews. Immunology* **2**, 656-663 (2002).
103. Manaster, I. & Mandelboim, O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* **29 Suppl A**, S60-66 (2008).
104. Kopcow, H.D. *et al.* Human decidual NK cells from gravid uteri and NK cells from cycling endometrium are distinct NK cell subsets. *Placenta* **31**, 334-338 (2010).
105. Blois, S.M., Klapp, B.F. & Barrientos, G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol* **88**, 86-92 (2011).

106. Rajagopalan, S. & Long, E.O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Frontiers in immunology* **3**, 258 (2012).
107. Hanna, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* **12**, 1065-1074 (2006).
108. Keskin, D.B. *et al.* TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3378-3383 (2007).
109. Kwak-Kim, J. & Gilman-Sachs, A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* **59**, 388-400 (2008).
110. Carlino, C. *et al.* Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* **111**, 3108-3115 (2008).
111. Hanna, J. *et al.* CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* **102**, 1569-1577 (2003).
112. Boyson, J.E., Aktan, I., Barkhuff, D.A. & Chant, A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunological investigations* **37**, 565-582 (2008).
113. Dosiou, C. & Giudice, L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine reviews* **26**, 44-62 (2005).
114. Kim, C.H., Johnston, B. & Butcher, E.C. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* **100**, 11-16 (2002).
115. Taniguchi, M., Seino, K. & Nakayama, T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nature immunology* **4**, 1164-1165 (2003).
116. Ito, K. *et al.* Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 740-744 (2000).
117. McMurray, R.W., Suwannaroj, S., Ndebele, K. & Jenkins, J.K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **69**, 44-58 (2001).
118. Jansson, L. & Holmdahl, R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **47**, 290-301 (1998).
119. Bird, M.D., Karavitis, J. & Kovacs, E.J. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cellular immunology* **252**, 57-67 (2008).
120. Blois, S.M. *et al.* Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biology of reproduction* **77**, 590-598 (2007).
121. Bouman, A., Heineman, M.J. & Faas, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* **11**, 411-423 (2005).
122. Raghupathy, R. *et al.* Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol* **80**, 91-99 (2009).
123. Abrams, E.T. & Miller, E.M. The roles of the immune system in women's reproduction: evolutionary constraints and life history trade-offs. *American journal of physical anthropology* **146 Suppl 53**, 134-154 (2011).
124. Ramos-Medina, R., Corbi, A.L. & Sanchez-Ramon, S. [Intravenous immunoglobulin: immunomodulatory key of the immune system]. *Medicina clinica* **139**, 112-117 (2012).
125. Bayry, J., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. Shortage of human intravenous immunoglobulin--reasons and possible solutions. *Nature clinical practice. Neurology* **3**, 120-121 (2007).
126. Ephrem, A. *et al.* Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* **111**, 715-722 (2008).

127. Bussel, J.B. & Hilgartner, M.W. The use and mechanism of action of intravenous immunoglobulin in the treatment of immune haematologic disease. *British journal of haematology* **56**, 1-7 (1984).
128. Bussel, J. *et al.* Reversal of neutropenia with intravenous gammaglobulin in autoimmune neutropenia of infancy. *Blood* **62**, 398-400 (1983).
129. Bayary, J. *et al.* Intravenous immunoglobulin in autoimmune disorders: an insight into the immunoregulatory mechanisms. *International immunopharmacology* **6**, 528-534 (2006).
130. Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: back to the pre-antibiotic and passive prophylaxis era? *Trends in pharmacological sciences* **25**, 306-310 (2004).
131. Graphou, O. *et al.* Effect of intravenous immunoglobulin treatment on the Th1/Th2 balance in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* **49**, 21-29 (2003).
132. Coulam, C.B., Krysa, L.W. & Bustillo, M. Intravenous immunoglobulin for in-vitro fertilization failure. *Hum Reprod* **9**, 2265-2269 (1994).
133. Moraru, M. *et al.* Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells. *Am J Reprod Immunol* **68**, 75-84 (2012).
134. Bansal, A.S., Bajardeen, B. & Thum, M.Y. The basis and value of currently used immunomodulatory therapies in recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* **93**, 41-51 (2012).
135. Ruiz, J.E. *et al.* Effect of intravenous immunoglobulin G on natural killer cell cytotoxicity in vitro in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* **31**, 125-141 (1996).
136. Kwak, J.Y., Kwak, F.M., Ainbinder, S.W., Ruiz, A.M. & Beer, A.E. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively downregulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* **35**, 363-369 (1996).
137. Coulam, C.B. & Acacio, B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J Reprod Immunol* **67**, 296-304 (2012).
138. Quenby, S., Farquharson, R., Young, M. & Vince, G. Successful pregnancy outcome following 19 consecutive miscarriages: case report. *Hum Reprod* **18**, 2562-2564 (2003).
139. Hasegawa, I. *et al.* Effectiveness of prednisolone/aspirin therapy for recurrent aborters with antiphospholipid antibody. *Hum Reprod* **7**, 203-207 (1992).
140. Laskin, C.A. *et al.* Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. *N Engl J Med* **337**, 148-153 (1997).
141. Reznikoff-Etievant, M.F. *et al.* Habitual abortions in 678 healthy patients: investigation and prevention. *Hum Reprod* **14**, 2106-2109 (1999).
142. Palmirotta, R. *et al.* TNFA gene promoter polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Italian women. *Reprod Sci* **17**, 659-666 (2010).
143. Winger, E.E. & Reed, J.L. Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* **60**, 8-16 (2008).
144. Winger, E.E. *et al.* Birth defect rates in women using Adalimumab (Humira((R))) to treat immunologic-based infertility in IVF patients. *Am J Reprod Immunol* **66**, 237-241 (2011).
145. Granato, D. *et al.* Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* **24**, 113-118 (2000).

146. Krog, J., Hokland, M., Ahlburg, P., Parner, E. & Tonnesen, E. Lipid solubility- and concentration-dependent attenuation of in vitro natural killer cell cytotoxicity by local anesthetics. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* **46**, 875-881 (2002).
147. Scarpellini, F. & Sbracia, M. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum Reprod* **24**, 2703-2708 (2009).
148. Prietl, B. *et al.* Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases? *The Israel Medical Association journal : IMAJ* **12**, 136-139 (2010).
149. Vaquero, E. *et al.* Mild thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach. *Am J Reprod Immunol* **43**, 204-208 (2000).
150. Dwyer, J.M. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* **326**, 107-116 (1992).
151. Basta, M., Langlois, P.F., Marques, M., Frank, M.M. & Fries, L.F. High-dose intravenous immunoglobulin modifies complement-mediated in vivo clearance. *Blood* **74**, 326-333 (1989).
152. Basta, M. & Dalakas, M.C. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest* **94**, 1729-1735 (1994).
153. Durandy, A. *et al.* Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clinical and experimental immunology* **158 Suppl 1**, 2-13 (2009).
154. Sanchez-Ramon, S. *et al.* Long-term remission of severe refractory dermatopolymyositis with a weekly-scheme of immunoglobulin followed by rituximab therapy. *Rheumatology international* **30**, 817-819 (2010).
155. Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nature clinical practice. Rheumatology* **3**, 262-272 (2007).
156. MacMillan, H.F., Lee, T. & Issekutz, A.C. Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol* **132**, 222-233 (2009).
157. Ballou, M. The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology* **127**, 315-323; quiz 324-315 (2011).
158. De Groot, A.S. *et al.* Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood* **112**, 3303-3311 (2008).
159. Misra, N. *et al.* Intravenous immunoglobulin in neurological disorders: a mechanistic perspective. *Journal of neurology* **252 Suppl 1**, I1-6 (2005).
160. von Gunten, S. *et al.* Immunologic and functional evidence for anti-Siglec-9 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Blood* **108**, 4255-4259 (2006).
161. Aubin, E., Proulx, D.P., Trepanier, P., Lemieux, R. & Bazin, R. Prevention of T cell activation by interference of internalized intravenous immunoglobulin (IVIg) with MHC II-dependent native antigen presentation. *Clin Immunol* **141**, 273-283 (2011).
162. Aubin, E., Lemieux, R. & Bazin, R. Indirect inhibition of in vivo and in vitro T-cell responses by intravenous immunoglobulins due to impaired antigen presentation. *Blood* **115**, 1727-1734 (2010).
163. Siedlar, M. *et al.* Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Immunol* **139**, 122-132 (2011).

164. Zhao, C. *et al.* Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *Journal of proteome research* **8**, 4028-4038 (2009).
165. Arumugam, T.V. *et al.* Intravenous immunoglobulin (IVIg) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14104-14109 (2007).
166. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**, 670-673 (2006).
167. Vani, J. *et al.* Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmun Rev* **7**, 440-444 (2008).
168. Shoenfeld, Y. *et al.* Efficacy of IVIg affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus. *International immunology* **14**, 1303-1311 (2002).
169. Blank, M. *et al.* The efficacy of specific IVIg anti-idiotypic antibodies in antiphospholipid syndrome (APS): trophoblast invasiveness and APS animal model. *International immunology* **19**, 857-865 (2007).
170. Wu, R. *et al.* Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* **36**, 91-97 (2003).
171. Viard, I. *et al.* Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* **282**, 490-493 (1998).
172. Prasad, N.K. *et al.* Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol* **161**, 3781-3790 (1998).
173. Altnauer, F., von Gunten, S., Spath, P. & Simon, H.U. Concurrent presence of agonistic and antagonistic anti-CD95 autoantibodies in intravenous Ig preparations. *The Journal of allergy and clinical immunology* **112**, 1185-1190 (2003).
174. von Gunten, S. & Simon, H.U. Cell death modulation by intravenous immunoglobulin. *Journal of clinical immunology* **30 Suppl 1**, S24-30 (2010).
175. von Gunten, S. *et al.* Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies. *The Journal of allergy and clinical immunology* **119**, 1005-1011 (2007).
176. von Gunten, S. & Simon, H.U. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg). *Autoimmun Rev* **7**, 453-456 (2008).
177. Crow, A.R., Song, S., Semple, J.W., Freedman, J. & Lazarus, A.H. A role for IL-1 receptor antagonist or other cytokines in the acute therapeutic effects of IVIg? *Blood* **109**, 155-158 (2007).
178. Raju, R. & Dalakas, M.C. Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biological validation of clinically relevant genes. *Brain : a journal of neurology* **128**, 1887-1896 (2005).
179. Ghielmetti, M., Bellis, M., Spycher, M.O., Miescher, S. & Vergeres, G. Gene expression profiling of the effects of intravenous immunoglobulin in human whole blood. *Molecular immunology* **43**, 939-949 (2006).
180. Crow, A.R., Brinc, D. & Lazarus, A.H. New insight into the mechanism of action of IVIg: the role of dendritic cells. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **7 Suppl 1**, 245-248 (2009).
181. Bayry, J. *et al.* Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* **101**, 758-765 (2003).
182. Bayry, J. *et al.* Intravenous immunoglobulin abrogates dendritic cell differentiation induced by interferon-alpha present in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **48**, 3497-3502 (2003).

183. Tha-In, T. *et al.* Superior immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins on human T-cells and dendritic cells: comparison to calcineurin inhibitors. *Transplantation* **81**, 1725-1734 (2006).
184. Tha-In, T. *et al.* Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood* **110**, 3253-3262 (2007).
185. Paquin Proulx, D., Aubin, E., Lemieux, R. & Bazin, R. Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). *Clin Immunol* **135**, 422-429 (2010).
186. de Grandmont, M.J., Racine, C., Roy, A., Lemieux, R. & Neron, S. Intravenous immunoglobulins induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. *Blood* **101**, 3065-3073 (2003).
187. Basta, M. Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system: activation versus inhibition. *Molecular immunology* **45**, 4073-4079 (2008).
188. Armitage P, B.G. *Métodos no paramétricos*. (Barcelona; 1992).
189. Alvarez, R. *Estadística no paramétrica. El procedimiento Npar*. (Madrid; 1995).
190. Armitage P, B.G. *Comparación de varios grupos*. (Barcelona; 1992).
191. Carrasco JL, H.M. *Análisis de Regresión Lineal*. (Ciencia 3 SL, Madrid; 1993).
192. Carrasco JL, H.M. *Análisis de Regresión Logística*. (Ciencia 3 SL, Madrid; 1993).
193. Branch, D.W., Gibson, M. & Silver, R.M. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* **363**, 1740-1747 (2010).
194. Pantazi, A. *et al.* Comparative analysis of peripheral natural killer cells in the two phases of the ovarian cycle. *Am J Reprod Immunol* **63**, 46-53 (2010).
195. Huppertz, B., Berghold, V.M., Kawaguchi, R. & Gauster, M. A variety of opportunities for immune interactions during trophoblast development and invasion. *Am J Reprod Immunol* **67**, 349-357 (2012).
196. Ntrivalas, E.I. *et al.* Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* **16**, 855-861 (2001).
197. Park, D.W. *et al.* Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* **63**, 173-180 (2010).
198. Lu, Y. *et al.* Quantitative and functional changes in peripheral natural killer cells in women with reproductive failure after artificial insemination with donor sperm. *J Reprod Immunol* **91**, 83-89 (2011).
199. Coulam, C.B., Krysa, L., Stern, J.J. & Bustillo, M. Intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* **34**, 333-337 (1995).
200. Emmer, P.M. *et al.* Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56(pos)CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* **15**, 1163-1169 (2000).
201. Perricone, C. *et al.* High levels of NK cells in the peripheral blood of patients affected with anti-phospholipid syndrome and recurrent spontaneous abortion: a potential new hypothesis. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1574-1578 (2007).
202. Perricone, R. *et al.* High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol* **55**, 232-239 (2006).
203. Ramos-Medina R, G.-S.A., León J.A, Alonso B, Tejera- Alhambra M, Gil J, Caputo J.D, Seyfferth A, Aguarón A, Vicente A, Ordoñez D, Alonso J, Carrillo de Albornoz E, Carbone J, Caballero P, Fernandez-Cruz E, Ortiz-Quintana L and Sánchez-Ramón S New decision-tree model for defining the risk of Reproductive Failure. *American Journal of Reproductive Immunology in press* (2012).
204. Beaman, K.D. *et al.* Immune etiology of recurrent pregnancy loss and its diagnosis. *Am J Reprod Immunol* **67**, 319-325 (2012).

205. Kasper DL, B.E., Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jamenson JL *Enfermedades del tiroides*. (McGraw-Hill Interamericana, Madrid; 2005).
206. Haddow, J.E. *et al.* Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* **341**, 549-555 (1999).
207. Bergoglio, L.a.M., J Guía de consenso para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **40** (2006).
208. Buchholz, T. & Thaler, C.J. Inherited thrombophilia: impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* **50**, 20-32 (2003).
209. Brenner, B. Thrombophilia and fetal loss. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **29**, 165-170 (2003).
210. McNamee, K., Dawood, F. & Farquharson, R.G. Thrombophilia and early pregnancy loss. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **26**, 91-102 (2012).
211. Danza, A., Ruiz-Irastorza, G. & Khamashta, M. Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **26**, 65-76 (2012).
212. Bansal, A.S., Bajardeen, B., Shehata, H. & Thum, M.Y. Recurrent miscarriage and autoimmunity. *Expert review of clinical immunology* **7**, 37-44 (2011).
213. Shimada, S. *et al.* A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* **62**, 301-307 (2009).
214. Hutton, B. *et al.* Use of intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent miscarriage: a systematic review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **114**, 134-142 (2007).
215. Porter, T.F., LaCoursiere, Y. & Scott, J.R. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000112 (2006).
216. Stephenson, M.D. *et al.* Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod* **25**, 2203-2209 (2010).
217. Jablonowska, B. *et al.* Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin: a double-blind placebo-controlled study. *Hum Reprod* **14**, 838-841 (1999).
218. Heilmann, L., Schorsch, M. & Hahn, T. CD3-CD56+CD16+ natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. *Am J Reprod Immunol* **63**, 263-265 (2010).
219. van den Heuvel, M.J., Peralta, C.G., Hatta, K., Han, V.K. & Clark, D.A. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **58**, 447-459 (2007).
220. Stricker, R.B. & Winger, E.E. Update on treatment of immunologic abortion with low-dose intravenous immunoglobulin. *Am J Reprod Immunol* **54**, 390-396 (2005).
221. Winger, E.E. *et al.* Elevated preconception CD56+ 16+ and/or Th1:Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol* **66**, 394-403 (2011).
222. Clark, D.A., Coulam, C.B. & Stricker, R.B. Is intravenous immunoglobulins (IVIG) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF). *Journal of assisted reproduction and genetics* **23**, 1-13 (2006).
223. Hammarstrom, L. & Smith, C.I. Placental transfer of intravenous immunoglobulin. *Lancet* **1**, 681 (1986).
224. Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A.L., Zago, C.A. & Carneiro-Sampaio, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 985646 (2012).

- 225. Gardulf, A., Andersson, E., Lindqvist, M., Hansen, S. & Gustafson, R. Rapid subcutaneous IgG replacement therapy at home for pregnant immunodeficient women. *Journal of clinical immunology* **21**, 150-154 (2001).
- 226. Perricone, R. *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy in pregnant patients affected with systemic lupus erythematosus and recurrent spontaneous abortion. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 646-651 (2008).
- 227. Micheloud, D. *et al.* Efficacy and safety of Etanercept, high-dose intravenous gammaglobulin and plasmapheresis combined therapy for lupus diffuse proliferative nephritis complicating pregnancy. *Lupus* **15**, 881-885 (2006).
- 228. Berkowitz, R.L. *et al.* Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. *Obstetrics and gynecology* **110**, 249-255 (2007).